



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



DANIELLE FIGUERÊDO DA SILVA

**Estudo farmacognóstico e atividades biológicas de *Polygala
boliviensis* A.W. Benn.**

DANIELLE FIGUERÊDO DA SILVA

Estudo farmacognóstico e atividades biológicas de *Polygala boliviensis* A.W. Benn

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

Orientador: Prof. Dr. Hugo Neves Brandão
Co-orientador: Prof. Dr. Clayton Queiroz Alves
Co-orientador: Prof. Dr. Fabiano Machado Martins

Feira de Santana - BA
2020

Ficha catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

Silva, Danielle Figuerêdo da
S579e Estudo farmacognóstico e atividades biológicas de *Polygala boliviensis*
A.W.Benn / Danielle Figuerêdo da Silva. - 2020.
113f. : il.

Orientador: Hugo Neves Brandão
Coorientador: Clayton Queiroz Alves
Coorientador: Fabiano Machado Martins

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Feira de Santana.
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2020.

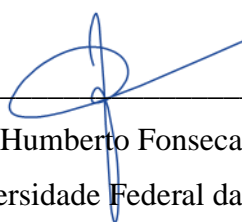
1. Polygalaceae. 2. Anatomia. 3. Atividade biológica. 4. Histoquímica.
5. Metabólitos secundários. 6. Sazonalidade. I. Brandão, Hugo Neves, orient.
II. Alves, Clayton Queiroz, coorient. III. Martins, Fabiano Machado, coorient.
IV. Universidade Estadual de Feira de Santana. V. Título.

CDU: 582.755

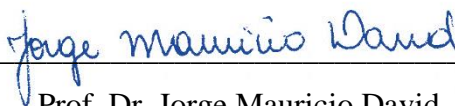
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Angélica Maria Lucchese
Universidade Estadual de Feira de Santana



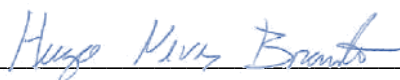
Prof. Dr. Humberto Fonseca de Freitas
Universidade Federal da Bahia



Prof. Dr. Jorge Mauricio David
Universidade Federal da Bahia



Prof. Dra. Larisse de Freitas Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Prof. Dr. Hugo Neves Brandão
Orientador e Presidente da Banca

À minha família por todo apoio de sempre.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me permitir concluir mais uma etapa importante da minha vida acadêmica.

À minha família, especialmente, mainha, Bel, Mô e Nide, por serem sempre meu porto seguro, terem absurda paciência comigo, me apoiarem e cuidarem de mim sempre que eu precisava.

A todos os meus amigos que sempre acreditaram em mim, principalmente “Os de Sempre” e a “Galera do espetinho”, que respeitavam minhas ausências e faziam de tudo para eu ficar menos estressada nesse percurso.

Às componentes do meu trio amado “Sucesso RGV”, Anne e Camila, que percorreram esse longo caminho do doutorado comigo, dividindo as alegrias e angústias e se tornaram grandes amigas e parte da minha família. Agradeço também à Camila pela ajuda nas análises estatísticas e pela moradia em Cruz das Almas.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa: Diego, Luiz, Juli, Raíssa, Carol, Laís, Lara, Carol Anne, Joice, Verena e Gabriel, e dos laboratórios da UEFS e do Horto: Janay, Larissa, Amanda, Andressa e Mariana. Vocês também fazem parte dessa conquista e fizeram os meus dias muito mais leves e divertidos, se tornaram grandes amigos e foram presentes da UEFS na minha vida. Além disso, à minha amiga, Isabella, que me acompanha nessa vida científica desde a graduação e foi muito importante em todos esses anos.

À minha psicóloga, Fernanda, que durante esses anos, me ajudou a entender minhas limitações e virtudes, e a lidar com as expectativas e frustrações nessa caminhada.

Ao professor Clayton pela coorientação, paciência na espera das propostas estruturais, pelos cafés e por ter se tornado um amigo. Com certeza você contribuiu muito para a realização desse trabalho.

Ao professor Fabiano pela coorientação, paciência na execução do experimento, pelos cafés, risadas no laboratório e as dicas de bike.

Ao meu orientador, Hugo, que me acolheu desde a iniciação científica, sempre me incentivou na carreira acadêmica, me inseriu em diferentes projetos, compartilhou comigo seu conhecimento nos mais diversos aspectos, me deu conselhos, mas também me ouviu bastante, dividiu comigo muitos lanches e problemas, me ajudando a crescer profissional e pessoalmente.

Ao botânico especialista na família, professor Dr. José Floriano Bârea Pastore, pela identificação do material vegetal, por estar sempre disposto para esclarecer dúvidas a respeito das espécies e pelas parcerias em diferentes trabalhos.

Ao Laboratório Baiano de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal da Bahia, e ao Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Vale do São Francisco, pela realização das análises de RMN.

Ao professor Dr. Franco Henrique Andrade Leite, da Universidade Estadual de Feira de Santana, aos professores Dr. Alex Gutterres Taranto, Dra. Amanda Luisa da Fonseca e Dr. Fernando de Pilla Varotti, da Universidade Federal de São João Del-Rei, e aos mestrados David Bacelar Costa Júnior e Paulo Otávio Lourenço Moreira e pela colaboração nos experimentos de atividade antiplasmodial e estudos *in silico*.

À FAPESB pelo apoio financeiro.

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

“Faça o teu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores, para fazer melhor ainda!”

Mário Sérgio Cortella

RESUMO

Estudos corroboram o uso popular de espécies do gênero *Polygala*, no entanto *Polygala boliviensis* A.W. Benn (Polygalaceae), encontrada no semiárido baiano, apresenta poucos estudos químicos e farmacológicos. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo realizar o estudo farmacognóstico e das atividades biológicas de *P. boliviensis*. A coleta das partes aéreas e raízes da espécie, para as diferentes etapas, foi realizada no *campus* da UEFS, em Feira de Santana, Bahia. Para o isolamento dos metabólitos secundários, foi preparado extrato metanólico por maceração, seguido de partição com hexano, clorofórmio e acetato de etila, e sucessivos procedimentos por cromatografia em coluna. A identificação dos metabólitos isolados foi realizada por RMN uni e bidimensionais, resultando nas estruturas químicas da 1,3,5-triidróxi-2-metóxi-xantona, do α -espinasterol, além de uma cumarina e mistura de ácido graxo que se encontram em fase de confirmação. Na avaliação da atividade biológica, as cumarinas aurapteno e poligaleno, isoladas anteriormente de *P. boliviensis*, foram avaliadas pelo teste de MTT e atividade antiplasmodial *in vitro* contra cepa cloroquina-resistente de *Plasmodium falciparum* (W2), e demonstraram $CI_{50} = 13,46 \pm 0,03 \mu\text{M}$ e $CE_{50} = 0,171 \pm 0,016$ para aurapteno; e acima de $100 \mu\text{M}$ e $0,164 \pm 0,012$ para poligaleno, resultando no índice de seletividade de 78,71 e 609,76, respectivamente. Essas cumarinas foram também submetidas à triagem virtual inversa baseada em *docking*, utilizando os alvos de *P. falciparum* do BraMMT, demonstrando melhor afinidade com enzimas purina nucleosídeo fosforilase e diidroorotato desidrogenase. Também foi realizada a avaliação da variação sazonal da composição química através da identificação e quantificação dos metabólitos secundários por CLAE-DAD; da atividade antioxidante, através do teste de sequestro do radical livre DPPH• e inibição da auto oxidação do β -caroteno; e da letalidade frente à *Artemia salina*. Por esse método, foram identificados ácido gálico, rutina, poligaleno, aurapteno e 7 picos majoritários desconhecidos, que através de espectros no UV, acredita-se tratar de ácidos fenólicos, flavonoides, xantonas, cumarinas e estilipironas. Apesar de não haver variação sazonal no rendimento dos extratos e no perfil químico, houve variação quantitativa dos metabólitos, da atividade antioxidante e letalidade frente à *A. salina*. Para a caracterização anatômica foi utilizada microscopia de luz, analisando amostras incluídas em historesina e coradas com azul de toluidina, enquanto para a histoquímica, as amostras foram seccionadas em criomicrotomo e submetidas a diferentes testes. *P. boliviensis* apresentou folhas anfiestomáticas e tricomas não glandulares nas folhas e caules, além de cavidades secretoras lisígenas encontradas nas folhas e responsáveis pela secreção de lipídios. O presente estudo contribui com a caracterização química da *P. boliviensis*, bem como para delimitações taxonômicas, facilitando a diferenciação entre espécies morfológicamente semelhantes, além de corroborar com a quimiosistemática do gênero *Polygala*. Somado a isso, a diversidade da composição química e atividade antiplasmodial demonstrada pelo aurapteno e poligaleno reforçam o potencial fitoterapêutico da espécie, porém como a sazonalidade influencia na quantidade desses e de outros metabólitos secundários, deve ser considerada, facilitando a determinação do período de coleta ou condições de cultivo ideais, para obtenção dos metabólitos de interesse.

Palavras-chave: Anatomia. Atividade biológica. Histoquímica. Metabólitos secundários. Sazonalidade.

ABSTRACT

Studies corroborate the popular use of species of the genus *Polygala*, however *Polygala boliviensis* A.W. Benn (Polygalaceae), found in the semi-arid region of Bahia, has few chemical and pharmacological studies. Thus, this work aimed to conduct a pharmacognostic study and the biological activities of *P. boliviensis*. The collection of the aerial parts and roots of the species, for the different stages, was performed at the UEFS campus, in Feira de Santana, Bahia. For the isolation of secondary metabolites, methanolic extract was prepared by maceration, followed by partition with hexane, chloroform and ethyl acetate, and successive procedures by column chromatography. The identification of the isolated metabolites was performed by one- and two-dimensional NMR, resulting in the chemical structures of 1,3,5-trihydroxy-2-methoxyxanthone, α -spinasterol, as well as a coumarin and fatty acid mixture that are in confirmation phase. In the evaluation of biological activity, the coumarins auraptene and polygalen, previously isolated from *P. boliviensis*, were evaluated by MTT test and *in vitro* antiplasmodial activity against chloroquine-resistant strain of *Plasmodium falciparum* (W2), and showed $IC_{50} = 13.46 \pm 0.03 \mu\text{M}$ and $EC_{50} = 0.171 \pm 0.016$ for auraptene; and above 100 μM and 0.164 ± 0.012 for polygalen, resulting in the selectivity index of 78.71 and 609.76, respectively. These coumarins were also subjected to docking-based inverse virtual screening using *P. falciparum* targets from BraMMT, demonstrating better affinity to purine nucleoside phosphorylase and dihydroorotate dehydrogenase enzymes. We also evaluated the seasonal variation of the chemical composition through the identification and quantification of secondary metabolites by HPLC-DAD; the antioxidant activity, through the DPPH-free radical scavenging test and inhibition of β -carotene auto-oxidation; and the lethality against *Artemia salina*. By this method, gallic acid, rutin, polygalen, auraptene, and 7 unknown major peaks were identified, which through UV spectra, are believed to be phenolic acids, flavonoids, xanthenes, coumarins, and styrylpyrones. Although there was no seasonal variation in the yield of extracts and chemical profile, there was quantitative variation of metabolites, antioxidant activity and lethality against *A. salina*. For the anatomical characterization light microscopy was used, analyzing samples included in historesin and stained with toluidine blue, while for histochemistry, the samples were sectioned in cryomicrotome and submitted to different tests. *P. boliviensis* showed amphistomatic leaves and non-glandular trichomes on the leaves and stems, in addition to lysigenous secretory cavities found in the leaves and responsible for lipid secretion. This study contributes to the chemical characterization of *P. boliviensis*, as well as to taxonomic delimitations, facilitating the differentiation between morphologically similar species, and corroborating the chemosystematics of the genus *Polygala*. Added to this, the diversity of the chemical composition and antiplasmodial activity demonstrated by auraptene and polygalen reinforce the phytotherapeutic potential of the species, but as seasonality influences the amount of these and other secondary metabolites, it should be considered, facilitating the determination of the collection period or ideal cultivation conditions, to obtain the metabolites of interest.

Keywords: Anatomy. Biological activity. Histochemistry. Seasonality. Secondary metabolites.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERÊNCIAS	13
CAPÍTULO 1: Isolamento e identificação de metabólitos secundários de <i>Polygala boliviensis</i> A.W. Benn (Polygalaceae)	16
1.1 Introdução	17
1.2 Material e métodos.....	18
1.2.1 Material vegetal.....	18
1.2.2 Extração, isolamento e identificação.....	18
1.3 Resultados e Discussão	20
1.3.1 Substâncias isoladas do extrato clorofórmico	20
1.3.1.1 FCPB ₁₂ C _{11a}	20
1.3.1.2 FCPB ₁₂ C ₁₁ C _{05a}	22
1.3.2 Substâncias isoladas do extrato hexânico.....	25
1.3.2.1 FHPB ₀₄ C ₀₂ S ₀₃₍₃₎	25
1.3.2.2 FHPB ₁₁ C ₀₅ C _{02a}	27
1.4 Conclusão.....	29
REFERÊNCIAS	29
CAPÍTULO 2: Atividade antiplasmodial de cumarinas isoladas de <i>Polygala boliviensis</i> A.W. Benn (Polygalaceae) e estudo <i>in silico</i>	33
2.1 Introdução	34
2.2 Material e métodos.....	35
2.2.1 Obtenção das cumarinas.....	35
2.2.2 Solubilização dos compostos para atividade biológica.....	35
2.2.3 Ensaio de citotoxicidade.....	36
2.2.4 Cultivo <i>in vitro</i> das fases intraeritrocitárias de <i>Plasmodium falciparum</i>	36
2.2.5 Determinação da parasitemia	37
2.2.6 Sincronização do cultivo de <i>Plasmodium falciparum</i>	37
2.2.7 Atividade antiplasmodial.....	37
2.2.8 Índice de Seletividade	38
2.2.9 Análise estatística.....	38
2.2.10 Triagem virtual inversa	38
2.3. Resultados e discussão.....	39
2.3.1 Atividade antiplasmodial.....	39

2.3.2 Triagem virtual inversa	40
2.4 Conclusão.....	43
REFERÊNCIAS	43
CAPÍTULO 3: Variação sazonal da composição química e das atividades biológicas de <i>Polygala boliviensis</i> A.W. Benn (Polygalaceae).....	48
3.1 Introdução	49
3.2 Material e métodos.....	50
3.2.1 Coleta e preparo dos extratos	50
3.2.2 Análise do perfil químico por CLAE-DAD	51
3.2.3 Quantificação das substâncias identificadas por CLAE-DAD.....	52
3.2.4 Validação do método de quantificação	52
3.2.5 Quantidade relativa das substâncias	53
3.2.6 Avaliação das atividades biológicas.....	53
3.2.6.1 Teste do sequestro do radical livre DPPH•	53
3.2.6.2 Inibição da auto oxidação do β -caroteno.....	54
3.2.6.3 Letalidade frente a <i>Artemia salina</i> (TAS)	54
3.2.7 Informações sobre as condições meteorológicas	55
3.2.8 Análise estatística.....	55
3.3 Resultados	55
3.3.1 Rendimento e perfil químico dos extratos.....	55
3.3.2 Identificação dos metabólitos secundários.....	57
3.3.3 Quantificação das substâncias identificadas	58
3.3.4 Validação do método de quantificação	58
3.3.5 Quantidade relativa dos picos majoritários	59
3.3.6 Avaliação das atividades biológicas.....	59
3.3.7 Influência dos elementos climáticos	60
3.3.8 Análise de cluster da composição química, atividades biológicas, elementos climáticos e período de coleta	61
3.4 Discussão	62
3.5 Conclusão.....	68
REFERÊNCIAS	68
CAPÍTULO 4: Anatomia e histoquímica dos órgãos vegetativos de <i>Polygala boliviensis</i> A. W. Benn. (Polygalaceae)	74
4.1 Introdução	75

4.2 Material e métodos.....	76
4.3 Resultados e Discussão	77
4.3.1 Anatomia da folha e pecíolo.....	77
4.3.2 Anatomia do caule.....	81
4.3.3 Histoquímica da folha	84
4.4 Conclusão.....	86
REFERÊNCIAS	86
CONCLUSÃO GERAL	90
APÊNDICES	91

INTRODUÇÃO GERAL

A utilização dos produtos naturais para alívio e cura de doenças é bastante difundida desde o início da história do homem até a atualidade. Os vegetais destacam-se nesse contexto, principalmente, devido à produção dos metabólitos secundários, também chamados de metabólitos especiais, que promovem a expressão de propriedades terapêuticas, incitando o interesse na pesquisa de novas substâncias a partir dessa fonte natural (YUNES; CECHINEL FILHO, 2014).

Espécies do gênero *Polygala*, pertencentes à família Polygalaceae, são utilizadas popularmente como expectorante, anti-inflamatória e para tratar distúrbios do sistema nervoso central, o que as torna fonte de interesse para estudos e desenvolvimento de novos produtos fitoterapêuticos. Estudos fitoquímicos indicam a presença de triterpenos, saponinas, xantonas, oligossacarídeos, lignanas e outros fenólicos no gênero *Polygala* (LACAILLE-DUBOIS, DELAUDE, MITAINE-OFFER, 2020).

Os metabólitos secundários são produzidos como resposta adaptativa das plantas às mudanças que ocorrem no desenvolvimento desses vegetais, o que inclui fatores bióticos e abióticos (ISAH, 2019). Devido a isso, em estudos que visam à utilização terapêutica de vegetais, é importante conhecer quais fatores influenciam na produção dos metabólitos secundários. Casanova e Costa (2017) ressaltam ainda a importância da padronização de extratos vegetais a partir de marcadores químicos, para que se garanta a segurança e reprodutibilidade dos efeitos biológicos.

Na maior parte dos casos, os metabólitos secundários são produzidos em um órgão e transportados para diferentes regiões da planta através dos tecidos vasculares, podendo ainda ficar armazenados e ser secretados por vacúolos ou estruturas secretoras, como idioblastos, ductos e tricomas (ISAH, 2019). A caracterização anatômica permite a detecção dessas estruturas, e a histoquímica, a identificação das classes de metabólitos produzidos em cada estrutura, tecido, e/ou órgão, sendo de suma importância na identificação do vegetal e na diferenciação de espécies semelhantes (FONSECA; MEIRA; CASALI, 2008). No entanto, poucos são os trabalhos sobre a anatomia dos órgãos vegetativos das espécies de Polygalaceae, em especial do gênero *Polygala* (DIAS, YANOMOTO, CASTRO, 2012).

A *Polygala boliviensis* A.W. Benn. (Polygalaceae) é uma espécie encontrada no semiárido baiano, que apresenta poucos estudos na literatura. O Grupo de Pesquisa Estudos Químicos e Atividades Biológicas em Produtos Naturais realizou estudos que possibilitaram a quantificação de salicilato de metila (ROCHA et al., 2012), isolamento e identificação de

cumarina inédita, poligaleno, com atividade imunomoduladora (SILVA et al., 2016), e efeito antiedematogênico e antinociceptivo *in vivo* (ROCHA et al., 2019).

Tendo em vista os resultados prévios obtidos que mostram o potencial fitoterapêutico da espécie, observa-se a importância de pesquisas que aprofundem a caracterização da mesma em diferentes aspectos, contribuindo assim para o melhor aproveitamento da referida espécie, bem como com informações que possam gerar estratégias de conservação e utilização sustentável desse recurso genético vegetal.

Nesse sentido, esse trabalho teve como objetivo realizar o estudo farmacognóstico e das atividades biológicas da *P. boliviensis*. Para isso traçou-se como objetivos específicos: isolar constituintes químicos provenientes do metabolismo especial; determinar a estrutura das substâncias isoladas; avaliar atividade antiplasmodial das substâncias isoladas; quantificar os metabólitos secundários em extratos, obtidos em diferentes períodos de coleta, por cromatografia a líquidos de alta eficiência com detector de arranjo de diodos; avaliar a atividade antioxidante e letalidade frente à *Artemia salina* dos extratos, obtidos em diferentes períodos de coleta; e caracterizar anatômica e histoquímica dos órgãos vegetativos da referida espécie.

REFERÊNCIAS

- CASANOVA, L.M.; COSTA, S.S. Interações Sinérgicas em Produtos Naturais: Potencial Terapêutico e Desafios. **Revista Virtual de Química**, v. 9, p. 575-595, 2017.
- DIAS, A.C.A.A.; YAMAMOTO, K.; CASTRO, M.M. Anatomia foliar de cinco espécies de *Polygala* de restinga e cerrado. **Rodriguésia**, v. 63, n.2, p. 395-404, 2012.
- FONSECA, M.C.M.; MEIRA, R.M.S.A.; CASALI, V.W.D. Anatomia dos órgãos vegetativos e histolocalização de compostos fenólicos e lipídicos em *Porophyllum ruderale* (Asteraceae). **Planta Daninha**, v. 24, p. 707-713, 2006.
- ISAH, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biological Research**, v. 52, p. 1-25, 2019.
- LACAILLE-DUBOIS; M-A.; DELAUDE, C.; MITAINE-OFFER, A-C. A review on the phytopharmacological studies of the genus *Polygala*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 249, 112417, 2020.
- ROCHA, J.L.C. et al. Evaluation of Biological Activity of *Polygala boliviensis* in Experimental Models. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 18, p. 793-802, 2019.
- ROCHA, J.L.C. et al. Quantificação de salicilato de metila em quatro gêneros de Polygalaceae por CLAE-DAD. **Química Nova**, v.35, p. 2263-2266, 2012.
- SILVA, D.F. et al. Poligalen, a new coumarin from *Polygala boliviensis*, reduces the release of TNF and IL-6 independent of NF-κB downregulation. **Fitoterapia**, v. 113, p. 139-143, 2016.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. (Org.) **Química de produtos naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 4 ed. Itajaí: Univali, 2014. p. 9-37.

CAPÍTULO 1

**Isolamento e identificação de metabólitos secundários de *Polygala boliviensis* A.W. Benn
(Polygalaceae)**

CAPÍTULO 1: Isolamento e identificação de metabólitos secundários de *Polygala boliviensis* A.W. Benn (Polygalaceae)

Resumo

A família Polygalaceae apresenta cerca de 27 gêneros e 1300 espécies descritas, até o momento, com ampla distribuição no mundo, sendo que no Brasil, o gênero *Polygala* é o mais representativo. Estudos com *Polygala* spp. apontam uma diversidade de metabólitos secundários e atividades biológicas, contudo poucos estudos químicos foram realizados com *Polygala boliviensis*. Assim, o objetivo do trabalho foi isolar e identificar metabólitos secundários dessa espécie. Para isso, partes aéreas e raízes de *P. boliviensis* foram coletadas na cidade de Feira de Santana, Bahia e seca em estufa a $45 \pm 3^\circ\text{C}$. Em seguida, o material vegetal foi pulverizado em liquidificador industrial e submetido à maceração com metanol. Para isolamento dos constituintes químicos, o extrato bruto foi particionado sequencialmente com hexano, clorofórmio e acetato de etila, e as porções hexano e clorofórmio foram submetidas a sucessivos processos de separação por cromatografia em coluna, utilizando sílica gel ou Sephadex® LH20 como fase estacionária, e mistura de diferentes solventes como fase móvel. Quatro amostras apresentaram precipitado e foram avaliadas por ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais. Foram identificadas a substância inédita 1,3,5-triidróxi-2-metóxi-xantona e o α -espinasterol, além de uma cumarina e uma possível mistura de ácido palmítico e palmitato de metila, que se encontram em fase de confirmação das estruturas químicas. Esse é o primeiro relato do isolamento desses metabólitos em *P. boliviensis*, e o primeiro relato da 1,3,5-triidróxi-2-metóxi-xantona na literatura. Dessa forma, o presente trabalho contribui para a quimiotaxonomia do gênero, bem como traz novas perspectivas para a avaliação biológica das substâncias isoladas.

Palavras-chave: Cumarinas. Cromatografia. Esteroides. Xantonas.

Abstract

So far, the Polygalaceae family has about 27 genera and 1300 different species, widely distributed through the world. The most represented genus in Brazil is the *Polygala*. Studies with *Polygala* spp. point to a diversity of secondary metabolites and biological activities, however few chemical studies have been carried out with *Polygala boliviensis*. Thus, the objective of the work was to isolate and identify secondary metabolites of this species. For this, aerial parts and roots of *P. boliviensis* were collected in the city of Feira de Santana, Bahia and dried in an oven at $45 \pm 3^\circ\text{C}$. Then, the plant material was pulverized in an industrial blender and subjected to maceration with methanol. The crude extract was partitioned with hexane, chloroform and ethyl acetate. To obtain isolated chemical constituents, the hexane and chloroform portions were subjected to successive chromatographic processes by column chromatography, using silica gel or Sephadex® LH20 as a stationary phase, and mixture of different solvents as a mobile phase. Four samples showed a high degree of purity and were evaluated by ^1H and ^{13}C one-dimensional and two-dimensional nuclear magnetic resonance. The unprecedented substance 1,3,5-trihydroxy-2-methoxy-xanthone and α -spinasterol have been identified, as well as coumarin and a possible mixture of palmitic acid and methyl palmitate, but they are in the process to have their chemical structures confirmed. This is the first report of the isolation of these metabolites in *P. boliviensis*, and the first report of 1,3,5-trihydroxy-2-methoxy-xanthone in the literature. Thus, the present work contributes to the chemotaxonomy of the genus, as well as bringing new perspectives for the biological evaluation of isolated substances.

Keywords: Chromatography. Coumarins. Steroids. Xanthones.

1.1 Introdução

A família Polygalaceae é representada por cerca de 27 gêneros e 1300 espécies descritas, até o momento, com ampla distribuição no mundo (PASTORE, 2016). A distribuição se dá em regiões temperadas, quentes e tropicais (FURNESS; STAFFORD, 1995). No Brasil, está representada por 11 gêneros e 198 espécies, das quais, as espécies do gênero *Polygala* correspondem a cerca de 75% (MARQUES; PASTORE, 2006; PASTORE *et al.*, 2015a).

Investigações com espécies do gênero *Polygala* mostram interessantes propriedades farmacológicas, a exemplo da *P. paniculata* com efeito antinociceptivo opioide, anti-inflamatório, protetor gástrico (LAPA, 2006) e vasorrelaxante (LAPA *et al.*, 2011); *P. japonica*, apresentando efeito neuroprotetor (LI *et al.*, 2012); *P. karensium*, antiviral (DAO *et al.*, 2012), *P. sabulosa*, como antidepressiva (CAPRA *et al.*, 2010) e tripanocida (PIZZOLATTI *et al.*, 2008); *P. tenuifolia*, utilizada para tratamento de amnésia, ansiedade, insônia, asma, bronquite (FANG *et al.*, 2012) e como anti-inflamatória (CHEONG *et al.*, 2011).

Estudos fitoquímicos mostram diversos metabólitos especiais no gênero *Polygala*, tais como saponinas triterpênicas (HUA; CHEN; ZHOU, 2010; LI *et al.*, 2012), xantonas (DAO *et al.*, 2012), cumarinas, flavonoides (CAPRA *et al.*, 2010; PIZZOLATTI *et al.*, 2008) e lignanas (DALL'ACQUA *et al.*, 2002), além da presença de salicilato de metila, encontrado principalmente em suas raízes (ROCHA *et al.*, 2012).

A espécie *Polygala boliviensis* A.W. Benn (Polygalaceae) é encontrada no Brasil, porém não é endêmica, sendo distribuída também em outros países da América do Sul (COELHO; AGRA; BARACHO, 2008; GÓMEZ, 2012; PASTORE *et al.*, 2015b). Estudos anteriores relataram a presença de salicilato de metila nas partes aéreas e raízes de *P. boliviensis* (ROCHA *et al.*, 2012), e das cumarinas, aurapteno e poligaleno (SILVA, 2015), o que demonstra uma importância farmacológica para a espécie. No entanto poucos estudos químicos foram realizados com *P. boliviensis*, assim, observa-se a importância da realização da identificação dos metabólitos secundários presentes nesta espécie, contribuindo dessa forma com a quimiotaxonomia da família e como alternativa na busca de novas substâncias ativas para o desenvolvimento de fármacos.

Nesse sentido, os objetivos do trabalho foram isolar e identificar metabólitos secundários do extrato metanólico das partes aéreas e raízes de *P. boliviensis*.

1.2 Material e métodos

1.2.1 Material vegetal

A coleta foi realizada em julho de 2013, no *campus* da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia (12°16'00"S e 38°58'00"W). A autorização de acesso ao patrimônio genético vegetal foi obtida junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (AAE56F0) e o material foi identificado pelo botânico especialista na família Dr. Floriano Bârea Pastore, comparando o material coletado com a exsicata (HUEFS168956) depositada no herbário da mesma universidade.

1.2.2 Extração, isolamento e identificação

Todo o material vegetal coletado, formado por partes aéreas e raízes, foi agrupado e seco em estufa a $45 \pm 3^\circ\text{C}$, durante 15 dias, até peso constante. Em seguida, o material foi pulverizado (8,16 kg), e submetido a cinco macerações com metanol, a temperatura ambiente, utilizando volume de solvente suficiente para cobrir o material vegetal, e a troca de solvente foi realizada a cada 48h. O extrato metanólico obtido foi então filtrado e concentrado em evaporador rotativo, com banho a $60 \pm 1^\circ\text{C}$.

O extrato bruto seco (EBPB – 1,66 kg) foi ressuscitado em metanol/água (9:1) e particionado com hexano para obtenção da fração hexânica (FHPB). À torta foi adicionada água para obter uma proporção de 6:4 metanol:água para partição com clorofórmio e obtenção da fração clorofórmio (FCPB). Em seguida, o metanol foi evaporado e seguiu-se com partição com acetato de etila, na qual foi obtida a fração acetato de etila (FAPB).

A partição foi realizada três vezes, para isso em todas as etapas da partição foi utilizado o mesmo volume da fase aquosa para o solvente extrator, dividido em três partes iguais, para otimizar o processo.

As porções de FAPB, FCPB e FHPB foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) com placas de sílica gel (Merck) com diferentes misturas de solventes (hexano: acetato de etila e metanol/clorofórmio). As placas foram reveladas com vapor de iodo e/ou sob luz ultravioleta (UV) (254/365 nm). Os solventes que promoveram melhor separação cromatográfica foram selecionados como fase móvel para a cromatografia em coluna (CC).

A FAPB (4,2 g) foi submetida à CC, utilizando sílica gel 60 (Acros, 0,063-0,200 mm) como fase estacionária, e fase móvel diclorometano:metanol, resultando em 17 sub-frações (FAPB₀₁-FAPB₁₇). No entanto, como as frações apresentaram pouca massa, e não apresentaram precipitado, esse extrato não foi utilizado na continuidade dos experimentos.

A purificação da FCPB (291,11g) foi realizada por CC, utilizando também sílica gel 60 (Acros, 0,063-0,200 mm) como fase estacionária, e fase móvel hexano:acetato de etila, em gradiente crescente de polaridade, resultando em 20 sub-frações (FCPB₀₁-FCPB₂₀).

Para a FCPB₁₂ (8,8208 g) utilizou-se sílica gel 60 (Acros, 0,063-0,200 mm) e, como eluente, diclorometano:metanol, gerando 17 frações (FCPB₁₂C₀₁-FCPB₁₂C₁₇). A FCPB₁₂C₁₁ apresentou precipitado que foi separado da fração pela trituração química com diclorometano (FCPB₁₂C_{11a}).

A FCPB₁₂C₁₁ (1,6873g) foi submetida a outro processo cromatográfico com sílica gel e sistema de solvente hexano:acetato de etila, obtendo-se 10 frações (FCPB₁₂C₁₁C₀₁-FCPB₁₂C₁₁C₁₀). A FCPB₁₂C₁₁C₀₅ apresentou precipitado que foi purificado por trituração química com acetona (FCPB₁₂C₁₁C_{05a}).

A fração hexânica (75,00 g) também foi submetida a cromatografia em coluna com sílica gel e, como fase móvel, hexano:acetato de etila, resultando em 32 frações (FHPB₀₁-FHPB₃₂). A FHPB₀₄ (3,2680 g) foi purificada utilizando a mesma fase estacionária, porém com sistema de gradiente com hexano:acetona, convertendo-se em 16 frações (FHPB₀₄C₀₁- FHPB₀₄C₁₆).

As frações FHPB₀₄C₀₂ a FHPB₀₄C₀₅ foram unidas, para aumentar a massa, e submetidas a cromatografia com gel de dextrana, como fase estacionária e, como fase móvel, clorofórmio:metanol (6:4), resultando em três frações (FHPB₀₄C₀₂S₀₁- FHPB₀₄C₀₂S₀₃). A FHPB₀₄C₀₂S₀₃ foi submetida ao mesmo tipo de cromatografia e três frações foram obtidas (FHPB₀₄C₀₂S₀₃₍₁₎- FHPB₀₄C₀₂S₀₃₍₃₎).

A FHPB₁₁ (4,3000 g) foi purificada por cromatografia com sílica gel e sistema de gradiente com hexano:acetona, gerando 11 frações (FHPB₁₁C₀₁- FHPB₁₁C₁₁). A fração FHPB₁₁C₀₅ (0,8948g) apresentou precipitado, porém para purificá-lo foi necessário submetê-la a nova CC, nas mesmas condições da anterior, que resultaram em quatro frações (FHPB₁₁C₀₅C₀₁-FHPB₁₁C₀₅C₀₄). A FHPB₁₁C₀₅C₀₂ apresentou precipitado (FHPB₁₁C₀₅C_{02a}) que foi purificado por trituração química com acetona.

Os precipitados obtidos foram avaliados por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (uma e duas dimensões), conduzida em Espectrômetro INOVA 500 operando a 500 MHz (¹H) ou Espectrômetro Bruker™ 400 MHz ASCEND III a 400 MHz (¹H), e a 125 MHz (¹³C), usando clorofórmio ou acetona como solvente, e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

1.3 Resultados e Discussão

As estruturas químicas das substâncias isoladas foram propostas através de dados de RMN uni e bidimensionais e em comparação com a literatura, quando possível.

1.3.1 Substâncias isoladas do extrato clorofórmico

1.3.1.1 FCPB₁₂C_{11a}

FCPB₁₂C_{11a} (50 mg) foi isolado como sólido amorfo de coloração amarela e foi identificado como a 1,3,5-triidróxi-2-metóxi-xantona (Figura 1), apresentando fórmula molecular C₁₄H₁₀O₆.

A tabela 1 e os Apêndices A a E mostram os sinais encontrados nas técnicas de RMN (uni e bidimensionais) da FCPB₁₂C_{11a}. A tabela 1 contempla ainda a comparação com os dados obtidos por Cristiano et al. (2003) de uma cumarina similar a descrita no presente trabalho, a 1,5-diidróxi-2,3-dimetoxixantona, isolada de *P. paniculata*. No entanto, a estrutura descrita difere da identificada no trabalho, pela presença de uma metoxila em C3, visto que a xantona isolada de *P. boliviensis* apresenta hidroxila em C3.

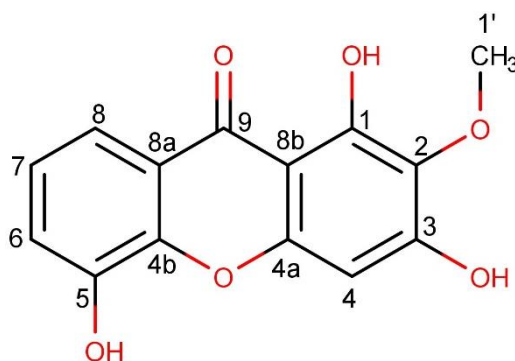


Figura 1 – Estrutura química da 1,3,5-triidróxi-2-metóxi-xantona

Através da análise do espectro de RMN de ¹H, foi possível observar a presença de um sinal em δ3,89 (3H, *s*, H1') característico de hidrogênios oximetínicos, assim como sinais de sistema aromático em δ7,36 (1H, *dd*, H6, J= 8,5 Hz e J= 1,5 Hz), δ7,28 (1H, *t*, H7, J=8,5 Hz e J=8,5 Hz) e δ 7,68 (1H, *dd*, H8, J= 8,5 Hz e J=1,5 Hz) que apresentaram constantes de acoplamento características de hidrogênios *orto* e *meta* relacionados. Além disso, o espectro mostrou sinal de simpleto em δ6,53 (1H, *s*, H4) referente a hidrogênio aromático, e em δ13,13, à hidroxila quelada ligada ao C1.

O espectro de RMN de ¹³C mostrou a presença de 14 carbonos. O espectro de *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence* (HMQC) permitiu atribuir o sinal em δ62,70 (C1') ao carbono metoxílico, confirmando a substituição dos carbonos vizinhos pelas hidroxilas, visto que esse deslocamento químico é característico de carbonila protegida. Os

sinais em δ 96,68 (C4), δ 123,25 (C6), δ 126,75 (C7) e δ 118,14 (C8) aos carbonos hidrogenados da estrutura principal da xantona. Os demais sinais que não foram visualizados no HMQC referem-se aos carbonos não hidrogenados, sendo o sinal em δ 184,08 (C9) atribuído ao carbono carbonílico; δ 155,78 (C1), δ 161,14 (C3) e δ 157,31 (C4a) referentes aos carbonos ligados às hidroxilas; δ 133,50 (C2) ao carbono ligado à metoxila; e δ 148,06 (C4b), δ 148,83 (C5), δ 123,70 (C8a) e δ 105,98 (C8b) aos demais carbonos não hidrogenados da xantona.

O espectro de *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC) permitiu confirmar a estrutura da molécula, visto que o sinal em δ 3,89 (H1') correlaciona com δ 133,50 (C2), confirmando a substituição da metoxila nesse carbono. As correlações entre δ 6,53 (H4) com os sinais em δ 155,78 (C1), δ 133,50 (C2), δ 161,14 (C3), δ 105,98 (C8b) e δ 184,08 (C9), confirmam a localização desse hidrogênio no anel B. Assim como as correlações entre δ 13,13 (1-OH) com os sinais em δ 133,50 (C2), δ 157,31 (C4a), δ 105,98 (C8b) confirmam a presença da hidroxila em C1. Por sua vez as correlações apresentadas pelos hidrogênios δ 7,36 (H6), δ 7,28 (H7) e δ 7,68 (H8) demonstram semelhante vizinhança química dos carbonos encontrados no anel A.

Tabela 1 - Sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C , correlações bidimensionais da FCPB₁₂C_{11a} e comparação com a literatura

Posição	Presente estudo*		Cristiano et al. (2003) C ₅ D ₅ N
	$\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^1\text{H}$ (<i>m</i> ; <i>J</i>)	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^1\text{H}$ (<i>m</i> ; <i>J</i>)
1	155,78; -	-	153,30; -
2	133,50; -	-	132,20; -
3	161,14; -	-	160,70; -
4	96,68; 6,53 (<i>s</i>)	105,98;133,50;155,78;161,14 ;184,08	90,90; 6,32 (<i>s</i>)
4a	157,31; -	-	154,50; -
4b	148,06; -	-	145,20; -
5	148,83; -	-	147,80; -
6	123,25; 7,35 (<i>dd</i> ; 8,5;1,5)	118,14; 148,06	121,20; 7,55 (<i>dd</i> ; 8,0;2,0)
7	126,75; 7,28 (<i>t</i> ; 8,5;7,5)	123,70;148,83	124,00; 7,30 (<i>t</i> ; 8,0)
8	118,14; 7,68 (<i>dd</i> ; 7,5;1,5)	123,25;148,06;184,08	115,10; 7,95 (<i>dd</i> ; 8,0;2,0)
8a	123,70; -	-	nd; -
8b	105,98; -	-	104,30; -
9	184,08; -	-	181,70; -
1'	62,70; 3,89 (<i>s</i>)	133,50	60,40; 3,98 (<i>s</i>)
2'	-	-	56,10; 3,73 (<i>s</i>)
1-OH	13,13	105,98; 133,50; 157,31	13,43

*Espectros foram analisados em acetona a 500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C). *m* representa a multiplicidade, valores de *J* estão entre parênteses e reportados em Hz; sinais químicos estão em ppm; nd corresponde a sinais de não descritos.

As xantonas são consideradas marcadores quimiotaxonômicos do gênero *Polygala*, sendo descritas em espécies como *P. glomerata*, *P. campestris*, *P. densiracemosa*, *P. linoides*

e *P. pulchella* e, frequentemente, apresentam o padrão de substituição 1,3,5 (LACAILLE-DUBOIS, DELAUDE, MITAINE-OFFER, 2020).

Venzke (2015) traz uma revisão descrevendo mais de 70 xantonas encontradas em espécies de *Polygala*, no entanto nenhuma corresponde a 1,3,5-triidróxi-2-metóxi-xantona, isolada no presente trabalho. Segundo Lacaille-Dubois, Delaude e Mitaine-Offier (2020), xantonas isoladas de *Polygala* apresentaram efeitos neuroprotetores, antioxidante, protetor do endotélio vascular, além de atuar em mecanismos contra células cancerígenas e na aterosclerose.

1.3.1.2 FCPB₁₂C₁₁C_{05a}

FCPB₁₂C₁₁C_{05a} (54,4 mg) foi isolado como pó de coloração branca e identificado como uma cumarina 7,8-dissubstituída (Figura 2), de fórmula molecular C₁₇H₁₄O₆. Os dados de RMN (uni e bidimensionais) estão apresentados na Tabela 2 e Apêndices F a K.

O espectro de RMN de ¹H mostrou sinais característicos de sistemas cumarínicos, sendo esses: δ6,32 (1H, *d*, H3, J = 9,6 Hz), δ7,66 (1H, *d*, H4, J = 9,6 Hz), δ7,48 (1H, *d*, H5, J = 8,8 Hz) e δ6,92 (1H, *d*, H6, J = 8,4 Hz), apresentando constantes de acoplamento de sistemas *orto* relacionados. Os demais sinais referem-se ao substituinte, no qual o sinal em δ2,55 (2H, *q*, J = 18,4 Hz) corresponde aos hidrogênios metilênicos; δ7,10 (1H, *s*) ao hidrogênio metínico; e δ1,25 (3H, *s*) e δ1,63 (3H, *s*) aos hidrogênios metílicos.

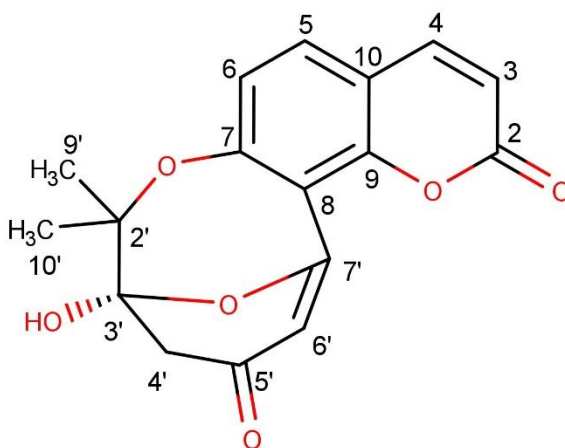


Figura 2 – Proposta da estrutura química da cumarina (FCPB₁₂C₁₁C_{05a})

Analisando o espectro de RMN de ¹³C, foram identificados 17 carbonos. Através do *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* (DEPT) 135, observou-se apenas um sinal negativo em δ43,32 (C4'), que se refere a um carbono metilênico presente no substituinte. Os demais sinais foram positivos, sendo atribuídos aos carbonos metínicos em sistemas aromáticos δ113,59 (C3), δ115,11 (C6), δ131,79 (C5), δ143,44 (C4); ao carbono olefínico δ128,34 (C6'); e aos carbonos metílicos δ21,65 (C9') e δ22,25 (C10') do substituinte.

Os demais sinais não foram visualizados no DEPT, dessa forma, correspondem aos carbonos não hidrogenados. Foram observados sinais característicos de cumarinas, como em $\delta 159,59$ (C2) referente à carbonila, e em $\delta 154,47$ (C9) e $\delta 112,83$ (C10), atribuídos aos carbonos não hidrogenados do anel cumarínico. Os sinais em $\delta 156,77$ (C7) e $\delta 104,91$ (C8) também fazem parte do anel cumarínico, porém esses valores costumam variar a depender do substituinte. Nesse caso, o sinal em $\delta 156,77$ foi atribuído ao C7, que está ligado a um átomo de oxigênio e $\delta 104,91$ ao C8 que possui hibridização sp^2 . Os sinais em $\delta 77,22$ (C3'), $\delta 82,61$ (C2'), $\delta 159,01$ (C7') e $\delta 204,77$ (C5') referem-se aos carbonos não hidrogenados do substituinte, sendo o sinal em $\delta 204,77$, característico de carbonila cetônica. Já os sinais em $\delta 77,22$ e $\delta 82,61$ foram atribuídos a carbonos ligados a oxigênio; e $\delta 159,01$ corresponde a carbono olefínico, ligado a oxigênio.

O espectro de HMQC possibilitou confirmar a ligação dos átomos de hidrogênios a cada átomo de carbono, enquanto que o HMBC permitiu avaliar a vizinhança química, confirmando a estrutura cumarínica e a substituição em C7 e C8.

Tabela 2 – Sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações bidimensionais da FCPB₁₂C₁₁C_{05a}

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^1\text{H}$ (<i>m</i> ; <i>J</i>)	HMBC
1	-	-
2	159,59; -	-
3	113,59; 6,32 (<i>d</i> ; 9,6)	112,83; 159,59
4	143,44; 7,66 (<i>d</i> ; 9,6)	131,79; 154,47; 159,59
5	131,79; 7,48 (<i>d</i> ; 8,8)	143,44; 154,47; 156,77
6	115,11; 6,92 (<i>d</i> ; 8,4)	104,91; 112,83; 156,77
7	156,77; -	-
8	104,91; -	-
9	154,47; -	-
10	112,83; -	-
1'	-	-
2'	82,61; -	-
3'	77,22; -	-
4'	43,32; 2,55 (<i>q</i> ; 18,4; 18,4)	77,22; 82,61; 159,01; 204,77
5'	204,77; -	-
6'	128,34; 7,10 (<i>s</i>)	43,32; 77,22; 104,91; 159,01; 204,77
7'	159,01; -	-
8'	-	-
9'	21,65; 1,25 (<i>s</i>)	22,25; 77,22; 82,61
10'	22,25; 1,63 (<i>s</i>)	21,65; 77,22; 82,61

Espectros foram analisados em clorofórmio a 400 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C). *m* representa a multiplicidade, valores de *J* estão entre parênteses e reportados em Hz; sinais químicos estão em ppm.

Analisando os espectros de HMBC, observa-se correlações entre $\delta 6,92$ (H6) e $\delta 104,91$, indicando que esse sinal faz parte da estrutura cumarínica, sendo atribuído ao C8. Do mesmo modo, $\delta 104,91$ (C8) correlaciona com $\delta 7,10$ (H6'), sugerindo proximidade química entre eles.

No entanto, $\delta 7,10$ (H6') correlaciona ainda com $\delta 77,22$ (C3'), indicando a propinquidade de H6' com o início da cadeia do substituinte, em C7. Isso que sugere que a estrutura do substituinte seja cíclica, pois, sendo uma cadeia aberta, as correlações entre H6' com C3' e C8, de forma concomitante, não seriam possíveis. Vale ressaltar que H6' correlaciona também com os sinais em $\delta 43,32$ (C4'), $\delta 204,77$ (C5') e $\delta 159,01$ (C7').

Além disso, foram observadas correlações em comum entre $\delta 1,25$ (H9') e $\delta 1,63$ (H10') com $\delta 21,65$ (C9') e $\delta 22,25$ (C10'), além dos carbonos não hidrogenados $\delta 82,61$ (C2') e $\delta 77,22$ (C3'), levando a concluir que as duas metilas apresentam ambiente químico semelhante, sugerindo-se que estas encontram-se ligadas ao mesmo carbono (C2').

Outras correlações que contribuíram com a proposta estrutural foram observadas entre os hidrogênios metilênicos $\delta 2,55$ (H4') com os carbonos não hidrogenados $\delta 82,61$ (C2'), $\delta 77,22$ (C3'), $\delta 204,77$ (C5') e $\delta 159,01$ (C7').

As cumarinas representam uma classe bastante relatada nas espécies do gênero *Polygala* (CAPRA et al., 2010; BORGES et al. 2014) e apresentam uma variedade de atividades biológicas. De acordo com a revisão realizada por Lacaille-Dubois, Delaude e Mitaine-Offer (2020), as cumarinas do gênero *Polygala* exibiram atividade anti-inflamatória por modelos *in vitro* e *in vivo*.

A cumarina isolada da fração FCPB₁₂C₁₁C_{05a} ainda necessita de outros experimentos para confirmação inequívoca da estrutura, como espectrometria de massas e/ou difração de raios X. No entanto, acredita-se que sua estrutura apresente um substituinte diferente daqueles comumente encontrado nas cumarinas (grupos alquila, furano ou pirano) (VENUGOPALA; RASHMI; ODHAV, 2013), da mesma forma que o poligaleno (Figura 3), cumarina também isolada do extrato clorofórmio de *P. boliviensis* (SILVA et al., 2016).

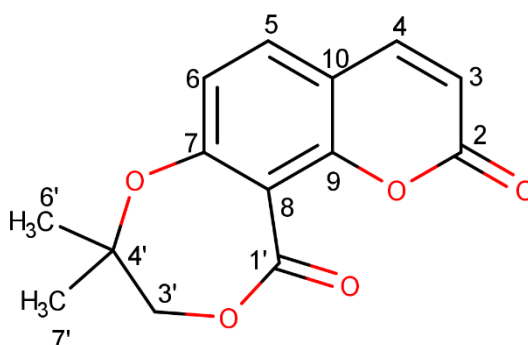


Figura 3 – Estrutura química do poligaleno

O poligaleno também apresenta um substituinte raro e a elucidação estrutural foi realizada por experimentos de RMN e confirmada por difração de raios-X. O poligaleno apresenta efeitos imunomoduladores, reduzindo os níveis de IL-6 e TNF, e potencializa a ativação do NF- κ B (SILVA et al., 2016). Além disso, outra cumarina, o aurapteno, também foi relatada na espécie (SILVA, 2015).

1.3.2 Substâncias isoladas do extrato hexânico

1.3.2.1 FHPB₀₄C₀₂S₀₃₍₃₎

FHPB₀₄C₀₂S₀₃₍₃₎ (65,9 mg) foi isolado na forma pastosa e com coloração branca. A partir da análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais (Tabela 3, Apêndice L a Q) foi possível verificar a presença de sinais característicos de substâncias alifáticas. Os dados observados sugerem que a fração corresponde a uma mistura de ácido palmítico, de fórmula molecular C₁₆H₃₂O₂, e palmitato de metila, C₁₇H₃₄O₂ (Figura 4).

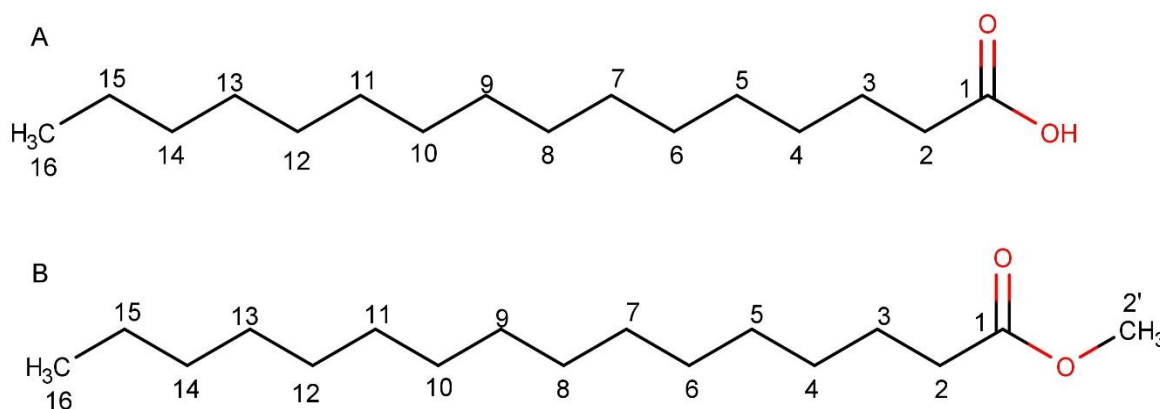


Figura 4 – Estrutura química do ácido palmítico (A) e do palmitato de metila (B)

O espectro de RMN de ¹H mostrou sinais característicos de ácidos graxos, como δ 0,90 (3H, *t*, H16, *J* = 7,0 Hz) referente aos hidrogênios metílicos terminais; δ 1,28 (24H, *s*, H4-H15) aos hidrogênios metilênicos (-CH₂)_n; δ 1,65 (2H, *q*, H3, *J* = 7,5 Hz; *J* = 7,0 Hz) que foi atribuído aos hidrogênios metilênicos β à carbonila; e δ 2,34 (2H, *dt*, H2, *J* = 7,5 Hz; *J* = 7,0 Hz; *J* = 8,0 Hz) referente aos hidrogênios metilênicos α à carbonila (BARCELOS, 1997). Foi observado também um sinal em δ 3,69 (3H, *s*, H2'), característico da presença de éster metílico (PIEREZAN, 2015).

O espectro de RMN ¹³C permitiu identificar dois sinais característicos de carbonilas em δ 174,41 e δ 178,95, cada sinal referente a uma estrutura, como confirmado no HMBC. Foram observados também sinais em δ 14,10 e δ 51,43 que, através da análise do DEPT 135 foram atribuídos à metila terminal (SAVI, 2009) e ao carbono metoxílico do éster, respectivamente, já que se apresentaram como os únicos sinais positivos. Os demais sinais de carbono,

apresentaram-se entre 20 e 40 ppm, sendo que, no DEPT 135, mostraram-se como sinais negativos e foram atribuídos aos carbonos metilênicos.

Tabela 3 – Sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C da FHPB₀₄C₀₂S₀₃₍₃₎

Posição	Ácido palmítico	Palmitato de metila
	$\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^1\text{H}$ (<i>m</i> ; <i>J</i>)	$\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^1\text{H}$ (<i>m</i> ; <i>J</i>)
1	178,95	174,41
2	33,87; 2,34 (<i>dt</i> ; 6,5; 7,5; 8,0)	33,87; 2,34 (<i>dt</i> ; 6,5; 7,5; 8,0)
3	24,70; 1,65 (<i>q</i> ; 7,0; 7,5)	24,70; 1,65 (<i>q</i> ; 7,0; 7,5)
4-15	1,28 (<i>s</i>)	1,28 (<i>s</i>)
16	14,10; 0,90 (<i>t</i> ; 7,0)	14,10; 0,90 (<i>t</i> ; 7,0)
1'	-	-
2'	-	51,37; 3,69 (<i>s</i>)

Espectros foram analisados em clorofórmio a 500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C). *m* representa a multiplicidade, valores de *J* estão entre parênteses e reportados em Hz; sinais químicos estão em ppm.

O HMQC confirmou a correlação entre os sinais $\delta 0,90$ (H16) e $\delta 14,10$ (C16); $\delta 1,65$ (H3) e $\delta 24,70$ (C3); $\delta 2,34$ (H2) e $\delta 33,87$ (C2); e $\delta 3,69$ (H2') e $\delta 51,37$ (C2'). O espectro de HMBC permitiu observar correlações entre $\delta 3,69$ (H2') e $\delta 174,41$ (C1), confirmando que esse sinal de carbono se refere a carbonila do éster. Foi observada também correlação dos hidrogênios metilênicos $\delta 2,34$ (H2) e $\delta 1,65$ (H3) com os sinais das carbonilas $\delta 174,41$ e $\delta 178,95$, confirmando que esses referem-se aos hidrogênios α e β às carbonilas. Além disso, há correlação entre $\delta 2,34$ (H2) e $\delta 24,70$ (C3) e vice-versa, $\delta 1,65$ (H3) e $\delta 33,87$ (C2), mostrando proximidade entre os mesmos. Outras correlações também foram observadas entre os hidrogênios metilênicos $\delta 1,28$ (H4-H15) e dos hidrogênios metílicos terminais $\delta 0,90$ (H16) com diferentes carbonos metilênicos da cadeia alifática.

Muitos ácidos graxos e ésteres desses ácidos apresentam sinais similares quando analisados por RMN, dessa forma, essa técnica não é suficiente para avaliar a pureza da amostra. Sendo assim, para a identificação inequívoca, é necessária análise adicional por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas. No entanto, com base na sugestão que a amostra corresponde a mistura do ácido palmítico com o palmitato de metila, a porcentagem relativa dos componentes foi deduzida através da análise da integração dos hidrogênios como descrito na literatura (GOULART et al., 1993).

O cálculo tomou como base a integração dos sinais correspondentes a H16, metila presente nas duas estruturas, cuja intensidade relativa foi de 3,18; e do H2', metoxila presente apenas no éster, com intensidade relativa de 1,0. O valor de 1,0 representa a integração para três hidrogênios do palmitato de metila, assim subtraindo esse valor de 3,18, obtém-se a intensidade correspondente aos três hidrogênios do ácido palmítico, que seria de 2,18.

Tomando-se a intensidade relativa de 3,18 como 100% da mistura, é possível deduzir que há 68,55% de ácido palmítico e 31,45% de palmitato de metila.

O ácido palmítico é um ácido graxo saturado, que juntamente com o ácido esteárico e os ácidos insaturados oleico e linoleico são predominantes nas plantas superiores (SAVI, 2009). Em *P. boliviensis* o ácido palmítico foi isolado com o éster metílico desse ácido, o palmitato de metila. Esse ácido graxo foi descrito também para a *Polygala arillata* (XIANG et al., 2019). De acordo com Salisu, Okpuzor e Jaja (2019) o ácido palmítico apresenta efeitos antioxidantes, antiaterosclerótico e hipocolesterolêmico.

1.3.2.2 FHPB₁₁C₀₅C_{02a}

FHPB₁₁C₀₅C_{02a} (20,9 mg) foi isolado como pó de coloração branca que foi identificado como o esteroide α -espinasterol, de fórmula molecular C₂₉H₄₈O (Figura 5). A tabela 4 e os Apêndices R a V mostram os sinais encontrados nas técnicas de RMN.

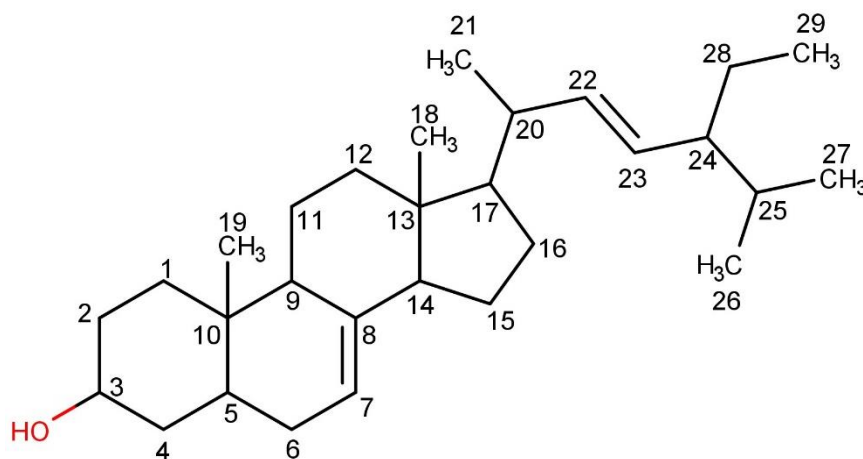


Figura 5 – Estrutura química do α -espinasterol

O espectro de RMN de ¹H mostrou perfil característico de esteroides. Foram observados sinais referentes a hidrogênios metílicos, sendo eles: um singlete em δ 0,55 (3H, *s*, H18), duplete em δ 0,85 (3H, *d*, H26, J = 6,4 Hz) e δ 1,03 (3H, *d*, H21, J = 6,8 Hz). Também foi observado multiplete em δ 0,81 (9H, *m*) que, segundo Pinheiro (1996), referem-se aos hidrogênios das demais metilas, ou seja, H19, H27 e H29.

Observa-se, ainda, um triplo triplo em δ 3,60 (1H, *tt*, H3) referente ao próton carbinólico, duplo duplete em δ 5,02 (1H, *dd*, H23) com constante de acoplamento vicinal de 8,8 Hz e característica de ligação dupla *trans* dissubstituída 15,2Hz, e multiplete em δ 5,16 (2H, *m*, H22 e H7) que apresentou J vicinal de 8,4 Hz e *trans* J de 15,2Hz, referente a cadeia lateral. Outras constantes de acoplamento desse multiplete foram atribuídas ao H7, J = 6,8 Hz e J = 2,4 Hz, características de hidrogênios *orto* e *meta* relacionados.

Tabela 4- Sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C , correlações bidimensionais da FHPB $_{11}\text{C}_{05}\text{C}_{02a}$ e comparação com a literatura

Posição	Presente estudo*	Pinheiro (1996) CDCl_3
	$\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^1\text{H}$ ($m;J$)	$\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^1\text{H}$ ($m;J$)
1	37,14; nd	37,09; nd
2	31,47; nd	31,41; nd
3	71,07; 3,60 (m)	71,03; 3,59 (m)
4	37,99; nd	37,92; nd
5	40,26; nd	40,20; nd
6	29,64; nd	29,59; nd
7	117,46; 5,16 (m ; 6,8; 2,4)	117,42; 5,14 (m)
8	139,57; -	139,52; -
9	49,44; nd	49,38; nd
10	34,22; -	34,17; -
11	21,55; nd	21,51; nd
12	39,46; nd	39,41; nd
13	43,29; -	43,24; -
14	55,13; nd	55,08; nd
15	23,02; nd	22,99; nd
16	28,52; nd	28,50; nd
17	55,89; nd	55,82; nd
18	12,06; 0,55 (s)	12,03; 0,55 (s)
19	13,06; 0,81 (m)	13,03; 0,79 (s)
20	40,85; nd	40,83; nd
21	21,38; 1,03 (d ; 6,8)	21,36; 1,02 (d ; 6,6)
22	138,18; 5,16 (m ; 8,4; 15,2)	138,16; 5,16 (dd ; 8,8; 15,2)
23	129,43; 5,02 (dd ; 8,8; 15,2)	129,37; 5,03 (dd ; 8,8; 15,2)
24	51,25; nd	51,21; nd
25	31,88; nd	31,85; nd
26	21,11; 0,85 (d ; 6,4)	21,09; 0,85 (d ; 6,3)
27	19,00; 0,81 (m)	18,96; 0,80 (d ; 6,4)
28	25,41; nd	25,38; nd
29	12,26; 0,81 (m)	12,24; 0,80 (t ; 7,3)

*Espectros foram obtidos em clorofórmio a 400 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C). m representa a multiplicidade, valores de J estão entre parênteses e reportados em Hz; sinais químicos estão em ppm; nd corresponde a sinais de não descritos.

Os espectros de RMN ^{13}C afirmam a presença de 29 carbonos, sendo seis metilas, δ 12,06 (C18), δ 13,06 (C19), δ 21,38 (C21), δ 21,11 (C26), δ 19,00 (C27) e δ 12,26 (C29); nove metilenos, δ 37,14 (C1), δ 31,47 (C2), δ 37,99 (C4), δ 29,64 (C6), δ 21,55 (C11), δ 39,46 (C12), δ 23,02 (C15), δ 28,52 (C16) e δ 25,41 (C28); oito carbonos metínicos, δ 71,07 (C3, ligado a hidroxila), δ 40,26 (C5), δ 49,44 (C9), δ 55,13 (C14), δ 55,89 (C17), δ 40,85 (C20), δ 51,25 (C24) e δ 31,88 (C25); dois carbonos quaternários δ 34,22 (C10) e δ 43,29 (C13); e sinais em δ 117,46 (C7), δ 139,57 (C8), δ 138,18 (C22) e δ 129,43 (C23) que indicam a presença de ligações duplas, sendo o deslocamento químico em δ 138,57 referente a uma dupla trissubstituída e os demais, às duplas dissubstituídas.

A comparação os dados de RMN obtidos com o trabalho de Pinheiro (1996) levaram a concluir que a substância se trata do α -espinasterol, que é um esteroide encontrado em poucas espécies, dentre elas espécies da família Polygalaceae, como *Bredemeyera floribunda* (PINHEIRO, 1996), e, recentemente descrito em espécies de *Polygala* encontradas no Brasil, a exemplo da *P. altomontana* (TIZZIANI et al., 2018a), e de *P. campestris*, *P. densiracemosa*, *P. linoides* e *P. pulchella* (TIZZIANI et al., 2018b). Quando isolado de *P. sabulosa* apresentou efeito anti-inflamatório comparado com a dexametasona (LACAILLE-DUBOIS, DELAUDE, MITAINE-OFFER, 2020).

1.4 Conclusão

A espécie *Polygala boliviensis* apresenta em sua composição química a 1,3,5-triidróxi-2-metóxi-xantona e α -espinasterol. Esse é o primeiro relato do isolamento desses componentes na espécie, e para a xantona é o primeiro relato na literatura. Além disso, é necessário ainda confirmar a estrutura de uma cumarina, possivelmente inédita, e da mistura de ácido palmítico e palmitato de metila.

O conhecimento químico da espécie contribui com a quimiotaxonomia do gênero *Polygala* e da família Polygalaceae, bem como traz novas perspectivas para a avaliação biológica das substâncias isoladas, ressaltando assim o potencial medicinal da *P. boliviensis* e a importância da caracterização e conservação desse promissor recurso genético vegetal do semiárido baiano.

REFERÊNCIAS

- BORGES, F.R.M. et al. Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract, dichloromethane fraction and steroid α -spinasterol from *Polygala sabulosa* in LPS-induced peritonitis in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.151, p. 144–150, 2014.
- CAPRA, J.C. et al. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: evidence for the involvement of monoaminergic systems. **European Journal of Pharmacology**, v. 643, p. 232–238, 2010.
- CHEONG, M.H. et al. Anti-inflammatory effects of *Polygala tenuifolia* root through inhibition of NF- κ B activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglial cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 402–408, 2011.
- COELHO, V.P.M.; AGRA, M.F.; BARACHO, G.S. Flora da Paraíba, Brasil: *Polygala* L. (Polygalaceae). **Acta botânica brasílica**, v. 22, p. 225-239, 2008.
- CRISTIANO, R. et al. Two Xanthenes from *Polygala paniculata* and Confirmation of the 1-hydroxy-2,3,5-trimethoxy-xanthone at Trace Level by HRGC-MS. **Zeitschrift für Naturforschung C A Journal of Biosciences**, v. 58, p. 490-494, 2003.

- DALL'ACQUA, S. et al. Cytotoxic compounds from *Polygala vulgaris*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, p. 1499-1501, 2002.
- DAO, T.T. et al. Xanthones from *Polygala karenium* inhibit neuraminidases from influenza A viruses. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 3688–3692, 2012.
- FANG, M. et al. Genetic diversity in natural populations of the medicinal herb *Polygala tenuifolia* Willd. and its implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 400–406, 2012.
- FURNESS, S.H.; STAFFORD, P.J. The Northwest European Pollen Flora, Polygalaceae. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 88, p. 61-82, 1995.
- GÓMEZ, S.E. Polygalaceae. **Aportes Botánicos de Salta**, v. 4, p. 1-22, 2012.
- GOULART, M.O.F. et al. Fitoconstituintes Químicos Isolados de *Jatropha Elliptica*. Atribuição dos Deslocamentos Químicos dos Átomos de Carbono e Hidrogênio dos Diterpenos Jatrolonas A e B. **Química Nova**, v. 16, p. 95-100, 1993.
- HUA, Y., CHEN, C.X., ZHOU, J. Two new triterpenoid saponins from *Polygala crotalarioides*. **Chinese Chemical Letters**, v. 21, p. 1107–1110, 2010.
- LACAILLE-DUBOIS; M-A.; DELAUDE, C.; MITAINE-OFFER, A-C. A review on the phytopharmacological studies of the genus *Polygala*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 249, 112417, 2020.
- LAPA, F. R. **Avaliação da Atividade Antinociceptiva, Antiinflamatória e Protetora Gástrica do Extrato Hidroalcoólico Bruto da *Polygala paniculata* L.** 2006. 120 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- LAPA, F.R. et al. Vasorelaxant and hypotensive effects of the extract and the isolated flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. **Jornal of Pharmacy and Pharmacology**, v.63, p. 875–881, 2011.
- LI, C. et al. Three triterpenoid saponins from the roots of *Polygala japonica* Houtt. **Fitoterapia**, v. 83, p. 1184–1190, 2012.
- MARQUES, M.C.M.; PASTORE, J.F.B. Duas espécies novas de *Polygala* L. (Polygalaceae) para o Brasil. **Rodriguésia**, v. 57, p. 99-102, 2006.
- PASTORE, J.F.B. A new endangered species of *Polygala* (Polygalaceae) from Niquêlandia, Goiás, Brazil. **Phytotaxa**, v. 288, p. 96–100, 2016.
- PASTORE, J.F.B. et al. Polygalaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015b. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB20543>>. Acesso em: 27 ago. 2018.
- PASTORE, J.F.B. et al. **Polygalaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015a. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB195>>. Acesso em: 27 ago. 2018.

- PINHEIRO, T.R. **Isolamento, identificação e avaliação do potencial farmacológico dos constituintes de *Polygala cyparissias* ST. HILL & MOQ.** 132 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal de Santa Catarina, 1996.
- PIREZAN, L. et al. Composição química e temperatura de cristalização de ésteres obtidos de quatro óleos vegetais extraídos de sementes de plantas do cerrado. **Química Nova**, v. 38, p. 328-332, 2015.
- PIZZOLATTI, M.G. et al. Trypanocidal activity of coumarins and styryl-2-pyrones from *Polygala sabulosa* A.W. Bennett (Polygalaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.177-182, 2008.
- ROCHA, J.L.C. et al. Quantificação de salicilato de metila em quatro gêneros de Polygalaceae por CLAE-DAD. **Química Nova**, v.35, p. 2263-2266, 2012.
- SALISU, T.F., OKPUZOR, J.E.; JAJA, S.I. Identification, characterization and quantification of chemical compounds in selected edible wild leafy vegetables. **Ife Journal of Science**, v. 21, p. 215-227, 2019.
- SAVI, J.O. **Acompanhamento do amadurecimento e análise do grão de arroz por Ressonância Magnética Nuclear – RMN.** 45f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.
- SILVA, D.F. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Polygala boliviensis* A.W. Benn (Polygalaceae).** 2015. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- SILVA, D.F. et al. Poligalen, a new coumarin from *Polygala boliviensis*, reduces the release of TNF and IL-6 independent of NF-κB downregulation. **Fitoterapia**, v. 113, p. 139-143, 2016.
- TIZZIANI, T. et al. Phytochemical and chemotaxonomic study of *Polygala altomontana* (Polygalaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 77, p. 1-3, 2018a.
- TIZZIANI, T. et al. A new xanthone as a chemical marker of four *Polygala* species (Polygalaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 78, p. 46-48, 2018b.
- VENUGOPALA, K.N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on natural coumarin lead compound for their pharmacological activity. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-14, 2013.
- VENZKE, D. **Estudo quimiosistemático de espécies do gênero *Polygala* e avaliação das propriedades biológicas.** 230f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Santa Catarina, 2015.
- XIANG, W. et al. Chemical constituents from the roots of *Polygala arillata* and their anti-inflammatory activities. **Journal of Chemistry**, ID 8079619, p. 1-9, 2019.

CAPÍTULO 2

**Atividade antiplasmodial de cumarinas isoladas de *Polygala boliviensis* A.W. Benn
(Polygalaceae) e estudo *in silico***

CAPÍTULO 2: Atividade antiplasmodial de cumarinas isoladas de *Polygala boliviensis* A.W. Benn (Polygalaceae) e estudo *in silico*

Resumo

Alternativas têm sido buscadas para o tratamento da malária devido ao aumento das cepas de *Plasmodium* resistentes às drogas atualmente utilizadas na terapia convencional. Como as cumarinas podem apresentar potencial antiplasmodico, esses metabólitos podem ser usados como alternativas de novos compostos ativos extraídos de plantas. As espécies de *Polygala* geralmente possuem cumarinas em sua composição química. Por isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antiplasmodica de cumarinas (aurapteno e poligaleno) contra a cepa resistente do *Plasmodium falciparum*. As cumarinas foram isoladas de *P. boliviensis* por cromatografia em coluna aberta e identificadas por técnicas de RMN. O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando MTT e a atividade antiplasmodica *in vitro* foi realizada com a cepa *P. falciparum* W2. Os resultados encontrados foram $CI_{50} = 13,46 \pm 0,03 \mu\text{M}$ e $CE_{50} = 0,171 \pm 0,016$ para aurapteno; e acima de $100 \mu\text{M}$ e $0,164 \pm 0,012$ para poligaleno, resultando no índice de seletividade de 78,71 e 609,76, respectivamente. A triagem virtual inversa no BraMMT pelo software OCTOPUS 1.2 foi aplicada para cumarinas para encontrar potenciais alvos de *P. falciparum* e mostrou menor energia de afinidade de aurapteno com fosforilase de nucleosídeo purina (PDB ID 3PHC) e poligaleno com diidroorotato desidrogenase (PDB ID 1TV5), que atua em síntese de purina e pirimidina necessária para o ciclo de vida de *P. falciparum*. Este estudo é o primeiro relato de aurapteno em *Polygala boliviensis*, e atividade antiplasmodica *in vitro* de aurapteno e poligaleno. Estudos *in silico* permitiram hipotetizar a inibição da purina nucleosídeo fosforilase e da diidroorotato desidrogenase de *P. falciparum* como mecanismo de ação das cumarinas. Assim, os resultados observados contribuem para o desenvolvimento de possíveis novos e potentes medicamentos para a malária.

Palavras-chave: Diidroorotato desidrogenase. Malária. *Plasmodium falciparum*. Polygalaceae. Purina nucleosídeo fosforilase.

Abstract

Alternatives have been sought for the treatment of malaria due to the increase of *Plasmodium* resistant strains to the drugs currently used in conventional therapy. As coumarins can show antiplasmodial potential, these metabolites can be used as alternative new active compounds extracted from plants. *Polygala* species usually have coumarins in their chemical composition. For this, the objective of this study was to evaluate the antiplasmodial activity of coumarins (auraptene and poligalen) against the *Plasmodium falciparum* resistant strain. The coumarins were isolated from *P. boliviensis* by open column chromatography and identified by NMR techniques. Cytotoxicity assay was performed using MTT and the antiplasmodial activity *in vitro* was performed with *P. falciparum* W2 strain. The results found were $IC_{50} = 13.46 \pm 0.03 \mu\text{M}$ and $IC_{50} = 0.171 \pm 0.016$ for auraptene and above $100 \mu\text{M}$ and 0.164 ± 0.012 for poligalen, resulting in the selectivity index of 78.71 and 609.76, respectively. Inverse virtual screening at BraMMT by OCTOPUS 1.2 software was applied for coumarins to find potential *P. falciparum* targets and showed higher affinity energy of auraptene with purine nucleoside phosphorylase (PDB ID 3PHC) and poligalen with dihydroorotate dehydrogenase (PDB ID 1TV5), which acts on purine and pyrimidine synthesis that is necessary for *P. falciparum* life cycle. This study is the first report of auraptene in *Polygala boliviensis*, and antiplasmodial activity *in vitro* of auraptene and poligalen. *In silico* studies allowed to hypothesize the inhibition of *P. falciparum* purine nucleoside phosphorylase and dihydroorotate dehydrogenase as a mechanism of action

of coumarins. Thus, the observed results contribute to the development of possible new and potent drugs for malaria.

Keywords: Dihydroorotate dehydrogenase. Malaria. *Plasmodium falciparum*. Polygalaceae. Purine nucleoside phosphorylase.

2.1 Introdução

Polygala boliviensis A.W. Benn (Polygalaceae) é uma espécie nativa do Brasil, distribuída em estados do Nordeste, como Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba e Piauí. Esta é encontrada na região do semiárido, em ambientes secos com solos argilosos, arenosos ou pedregosos (COELHO; AGRA; BARACHO, 2008).

Essa espécie é pouco estudada dos pontos de vista químico e farmacológico, no entanto investigações com *Polygala* spp. mostram interessantes propriedades biológicas, dentre essas, a atividade tripanocida de cumarinas e estilpironas isoladas de *P. sabulosa* (PIZZOLATTI et al., 2008), cumarinas de *P. karensium* com atividade antiviral (DAO et al., 2012), propriedade anticâncer do extrato da raiz de *P. senega* (PAUL et al., 2010), atividade antitumoral dos extratos brutos de *P. densiracemosa*, *P. campestris* e *P. molluginifolia* (TIZZIANI et al., 2017) e atividade antifúngica dos extratos de *P. campestris*, *P. cyparissias*, *P. paniculata*, *P. pulchella* e *P. sabulosa* (JOHANN et al., 2011).

Diferentes metabólitos são responsáveis pelas atividades das espécies de *Polygala*, sendo as estilpironas, xantonas e cumarinas são importantes classes encontradas nas espécies desse gênero (PIZZOLATTI et al., 2008; TIZZIANI et al., 2018). Dentre as cumarinas, o aurapteno já foi relatado nas espécies *P. paniculata* (HAMBURGER; GUPTA; HOSTETTMANN, 1985) e *P. altomontana* (TIZZIANI et al., 2018), enquanto o poligaleno foi descrito apenas em *P. boliviensis* (SILVA et al., 2016).

Estudos mostraram que cumarinas apresentam potencial antimalárico *in vitro* e *in vivo* e são candidatas promissoras para o tratamento da malária (HU et al., 2018). Algumas cumarinas apresentaram atividade contra *P. falciparum* (DASTAN et al., 2012; MOON et al., 2011), inclusive culturas cloroquina resistentes (PATEL et al., 2012), bem como contra *P. berghei*, apresentando maior atividade do que a cloroquina (ABBAS; SYAFRUDDIN, 2014).

A malária é a principal doença parasitária que causa mortes no mundo, sendo o *P. falciparum* responsável pela forma mais letal da doença (LUNEV et al., 2018). Atualmente, a eficácia da maioria dos antimaláricos comercializados tem sido comprometida pela evolução da resistência do parasita, reforçando a necessidade urgente de encontrar medicamentos com novos mecanismos de ação. Portanto, priorizar o novo *Plasmodium falciparum* validado é fundamental para diminuir a resistência (CROWTHER, et al., 2011).

O principal mecanismo de ação das drogas antimaláricas se dá pela inibição da polimerização do heme. No entanto já foram identificados outros alvos moleculares em *P. falciparum* que podem ser utilizados como estratégias para cepas resistentes (PENNA-COUTINHO et al., 2011).

Vários bancos de dados coletaram alvos de *P. falciparum*, no entanto, recursos como essencialidade, drogabilidade e amenidade são urgentes para a triagem virtual e triagem bioquímica de alto rendimento (CROWTHER, et al., 2011). Os dados sobre a essencialidade de supostos alvos de drogas para o crescimento do *Plasmodium* são limitados a alguns genes individuais que foram testados em estudos de interrupção de genes. Existem mais de 500 alvos validados para a triagem contra o parasita da malária (GUIGUEMDE et al., 2012).

Neste contexto, técnicas computacionais como a triagem virtual inversa baseada em *docking* (TVI) podem ser usadas para identificar o modo de ligação no alvo biológico particular do parasita. Em TVI baseado em *docking*, um ligante de consulta é usado para rastrear uma biblioteca de proteínas por programa de *docking* molecular para identificar alvos em potencial (XIANJIN; MARSHAL; XIAOQIN, 2018).

O aumento da resistência aos antimaláricos aliado à diversidade de metabólitos produzidos pelas plantas do semi-árido baiano desperta o interesse na pesquisa de compostos bioativos mais naturais. Assim, o estudo teve como objetivo avaliar as propriedades antimaláricas de cumarinas de *P. boliviensis* contra cepa resistente de *P. falciparum* e usar a triagem virtual inversa baseada em *docking* para identificar um alvo biológico potencial e descrever as interações intermoleculares por abordagens baseadas em estrutura computacional.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Obtenção das cumarinas

As cumarinas foram isoladas do extrato clorofórmico de *P. boliviensis* e identificadas, anteriormente, conforme descrito por Silva (2015).

2.2.2 Solubilização dos compostos para atividade biológica

As substâncias isoladas (aurapteno e poligaleno) e os padrões (cloroquina e artemeter), foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), não ultrapassando a concentração final de 0,01%. A solução estoque foi preparada em 10000 µg/mL e mantida a 4°C, em geladeira. Para os ensaios de citotoxicidade, as diluições foram realizadas com caldo *Roswell Park Memorial Institute médium* (RPMI), resultando nas concentrações entre 1000 e 0,1 µg/mL. Em seguida, foram feitas diluições seriadas, resultando nas concentrações finais na placa de células entre

100 e 0,006 µg/mL. Para o teste de atividade antiplasmodial, as amostras foram preparadas nas concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56 µg/mL.

2.2.3 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada utilizando a linhagem celular humana WI-26VA4 (fibroblasto pulmonar ATCC CCL-95.1) pelo teste de químico-sensibilidade 3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo (MTT) (MATSUZAKI et al., 2006). Após adquirir 80% de confluência, as células foram tripsinizadas com 1,5 mL da enzima tripsina (1:250 Sigma), incubadas a 37°C por cinco minutos, ressuspensas em 10 mL de meio completo e centrifugadas a 1200 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensado com meio completo (meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado pelo calor). As células foram distribuídas em microplacas de 96 poços a uma densidade de 4×10^5 células/100 µL por poço e incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 24h para a adesão das mesmas à placa. Após esse período de adesão o meio foi retirado, adicionado 180 µL de meio RPMI suplementado com 1% de SBF, para manter a cultura estável, e foram adicionados 20 µL das amostras (aurapteno, poligaleno, cloroquina e artemeter) em diferentes concentrações. As placas foram incubadas por mais 48 horas. No final do período de tratamento foram adicionados 100 µL/poço de solução de MTT (0,5 mg/mL em RPMI 1640 sem fenol) (DENIZOT; LANG, 1986). Após três horas de incubação na estufa de CO₂ a 37°C no escuro com o MTT, o sobrenadante foi aspirado e os cristais de formazan foram dissolvidos em 50 µL/poço com DMSO e mantidos a 37°C durante 10 minutos. A absorbância por poço foi medida em um comprimento de onda de 550 nm usando o espectrofotômetro de microplaca PowerWave HT da BioTek, com Gen5 (Data Analysis Software-Bio-Tek). A concentração que inibe em 50% o crescimento das células (CI₅₀) foi determinada em comparação com células cultivadas sem a presença das substâncias teste (considerada 100% de crescimento) a partir de curvas de concentração dose-resposta sigmoidal usando Software OriginPro versão 8.0 (PATRA et al., 2011; PEREIRA et al., 2012).

2.2.4 Cultivo *in vitro* das fases intraeritrocitárias de *Plasmodium falciparum*

Os parasitos da cepa W2 (cloroquina-resistente) foram obtidos em colaboração com o Instituto Rene Rachou (Fiocruz Minas, Brasil) e cultivados em hemácias humanas *in vitro* sob condições estabelecidas por Trager e Jensen (1976).

Os glóbulos vermelhos e o plasma humanos foram fornecidos pela Fundação de Hemoterapia e Hematologia de Minas Gerais (Fundação Hemominas, Brasil). Nenhum dos dados do paciente foi recebido junto com o plasma ou os glóbulos vermelhos.

Os parasitos foram cultivados em placas de Petri com hematócrito a 5% usando meio de cultivo completo (RPMI 1640 suplementado com 25 mM de Hepes, 21 mM de bicarbonato de sódio, 300 µM de hipoxantina, 11 mM de glicose, 40 µg/mL de gentamicina e 10% (v/v) de plasma humano inativado pelo calor). As placas foram mantidas a 37°C e a concentração adequada de oxigênio foi obtida pela combustão de uma vela, sendo realizadas trocas diárias de meio.

2.2.5 Determinação da parasitemia

A parasitemia foi monitorada diariamente em esfregaços fixados em metanol e corados em solução diluída de Giemsa (3 gotas/mL de solução salina tamponada pH 6,8) por 10 minutos, seguido de lavagem em água, secagem ao ar e análise ao microscópio óptico (1000x). Para parasitemia maior que 5%, 1000 hemácias foram contadas. No caso de infecções muito baixas, menos de 5%, foram contadas 6000. Nesse caso, a avaliação foi feita estimando o número total por campo, sendo considerados de 50 a 100 campos, estimando as hemácias infectadas. O cálculo da parasitemia foi realizado contando o número de hemácias infectadas, segundo a fórmula:

$$Parasitemia = \frac{\text{n}^\circ \text{ de hemácias parasitadas}}{\text{n}^\circ \text{ de hemácias totais}}$$

2.2.6 Sincronização do cultivo de *Plasmodium falciparum*

As culturas foram sincronizadas pelo método de sorbitol para obtenção de uma amostra com predomínio de fase jovem (anel) para os ensaios *in vitro* (LAMBROS; VANDERBERG, 1979). Após a adição de sorbitol (10 mL), a cultura do parasita foi mantida em condições ambientais de crescimento (37 °C e 5% de CO₂) por um período de 10 min. O conteúdo foi centrifugado a 2500 RPM por 5 min e o volume de sedimento foi utilizado para determinação do hematócrito, que foi ajustado para 2% com a adição do meio de cultura RPMI.

2.2.7 Atividade antiplasmodial

Inicialmente, foi realizado um ensaio preliminar de forma a avaliar se os compostos apresentaram atividade frente à cepa W2. Neste, culturas sincronizadas com 2% de parasitemia no estágio de anel, e 2% de hematócrito, foram distribuídas em microplacas de 96 poços, com 180 µL para cada poço. Acrescentou-se a cada poço 20 µL de meio RPMI, contendo as amostras (aurapteno e poligaleno) e padrões (cloroquina e artemeter) na concentração de 50 µg/mL. Após 24h de incubação dos parasitos a 37°C, o meio de cultura com ou sem adição dos compostos foi trocado em cada poço. Esfregaços sanguíneos de todas as amostras foram confeccionados

após 48h, corados com Giemsa e examinados ao microscópio óptico para a determinação da parasitemia. A média da parasitemia nos poços, sem adição da amostra e padrões, considerada como 100% de crescimento do parasito, foi comparada com as parasitemias nos poços que receberam as substâncias testadas. A atividade dos compostos foi expressa pela porcentagem de redução da parasitemia em relação aos controles sem a presença dos compostos, como indicado na equação abaixo:

$$\text{Redução da parasitemia (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{Parasitemia da substância teste}}{\text{Parasitemia do controle}} \times 100 \right)$$

Posteriormente, repetiu-se o teste com diferentes concentrações das amostras (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56 µg/mL) para determinação da concentração efetiva para reduzir a parasitemia em 50% (CE₅₀)

2.2.8 Índice de Seletividade

O índice de seletividade (IS) foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$IS = \frac{\text{CI}_{50} \text{ do composto em linhagem de células de mamíferos}}{\text{CE}_{50} \text{ do composto em linhagem parasitária}}$$

2.2.9 Análise estatística

Todas as experiências foram realizadas em triplicata. As CI₅₀ e CE₅₀ foram determinadas pelo decaimento exponencial com deslocamento pelo programa OriginPro versão 8.0. As demais análises estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguido do método de Tukey ($p \leq 0,05$). Para essas análises foi utilizado o software GraphPad Prism versão 5.0.

2.2.10 Triagem virtual inversa

As moléculas avaliadas nos ensaios fenotípicos foram utilizadas em uma triagem virtual inversa na base de dados Brazilian Malaria Molecular Targets (BRAMNT) pelo *software* OCTOPUS 1.2. (MAIA et al., 2017). Inicialmente, a estrutura química 2D da molécula foi gerada no programa Marvin® Sketch 6.0 (CHEMAXON, 2013) e posteriormente convertida para o formato 3D pelo módulo CONCORD, utilizando parâmetros padrões disponíveis na ferramenta *translate molecular file* da plataforma SYBYL®-X 2.0 (TRIPOS, 2010). Em seguida, as cargas parciais foram calculadas pelo método Gasteiger-Hückel (GASTEIGER; MARSILI, 1980), conforme disponível na plataforma SYBYL®-X 2.0. As etapas de minimização energética são implementadas na rotina do programa OCTOPUS 1.2, o qual utiliza

o *software* MOPAC2016 (BRANDON et al., 2015). A função de pontuação empregada no OCTOPUS 1.2 foi avaliada previamente frente a todos os alvos quanto à sua capacidade de reprodução da conformação experimental do ligante cristalográfico (RMSD <2,0), e métricas de desempenho como curva ROC e área sob a curva ROC (> 0,5) (NUNES et al., 2016). Após priorização do alvo com base na energia de afinidade, as interações intermoleculares do ligante com alguns resíduos de sítios ativos foram analisadas com a ajuda do servidor PLIP (<http://plip.biotech.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>; SALENTIN et al., 2015).

2.3. Resultados e discussão

2.3.1 Atividade antiplasmodial

No presente trabalho, as cumarinas testadas, aurapteno (1) e poligaleno (2) (Figura 1), apresentaram redução de parasitemia superior a 70% na concentração de 50 µg/mL no teste de atividade antiplasmodial. As moléculas que apresentam resposta biológica em concentrações abaixo de 100 µg/mL são consideradas ativas (KATSUNO et al., 2015), assim, como as cumarinas mostraram-se ativas, foi determinada a CE₅₀.

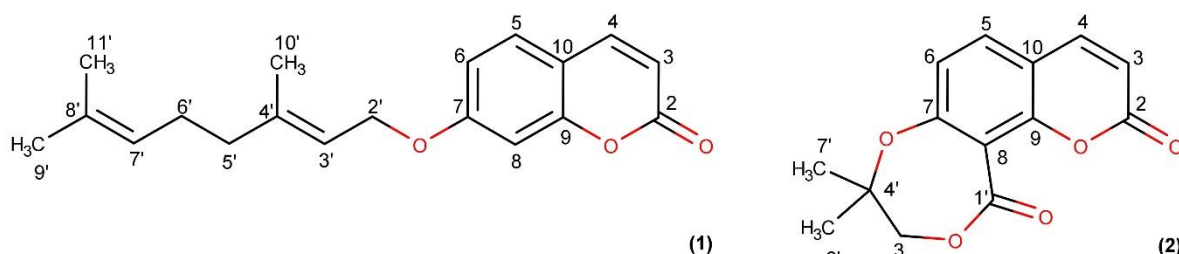


Figura 1 - Estrutura química das cumarinas isoladas do extrato clorofórmico de *P. boliviensis*

O aurapteno apresentou CE₅₀ para *P. falciparum* de $0,171 \pm 0,016$ µM e o poligaleno CE₅₀ de $0,164 \pm 0,012$ µM, sendo esse valor inferior ao padrão cloroquina e estatisticamente igual ao padrão artemeter. Além disso, no teste de citotoxicidade, o CI₅₀ foi de $13,46 \pm 0,03$ µM para aurapteno e acima de 100 µM para poligaleno, mostrando que uma concentração muito maior dessas substâncias seria necessária para causar danos às células humanas da cepa testada. Isso foi confirmado através do SI de 78,71 e 609,76, para aurapteno e poligaleno, respectivamente.

Segundo a fundação *Global Health Innovative Technology* (GHIT), os valores de CE₅₀ de *P. falciparum* devem ser <1µM, enquanto que a razão entre o IS deve ser superior a 10 vezes (KATSUNO et al., 2015), ou seja, o aurapteno e o poligaleno satisfazem aos parâmetros exigidos pela GHIT (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados *in vitro* da atividade antiplasmodial: CE₅₀ dos compostos contra a cepa W2 de *P. falciparum*, CI₅₀ na linhagem celular humana WI-26-VA-4 e índice de seletividade

Compostos	CE ₅₀ <i>P. falciparum</i> ± DP (µM)	Atividade Antiplasmodial	CI ₅₀ (µM) WI-26- VA4 ± DP (µM)	IS
Aurapteno	0,171 ± 0,016 ^a	Ativo	13,46±0,03	78,71
Poligaleno	0,164 ± 0,012 ^a	Ativo	>100,00	609,76
Cloroquina	0,570± 0,014 ^b	Ativo	>100,00	175,00
Artemeter	0,099 ± 0,090 ^a	Ativo	>100,00	>1000,00

ANOVA, Teste Tukey ($p \leq 0,05$). Amostras identificadas com mesma letra não apresentam diferença estatística.

Aurapteno já havia sido testado contra cepas resistentes de *Plasmodium falciparum*, porém a substância era inativa (LAPHOOKHIEO et al., 2011), diferindo dos resultados encontrados no presente estudo, em que o aurapteno apresentou atividade comparável a um dos padrões testados. No entanto, a diferença pode ser justificada, uma vez que os autores utilizaram outra cepa de *P. falciparum*, K1, bem como um método diferente de avaliação da atividade antimalárica, a técnica de radioisótopos de microcultura (LAPHOOKHIEO et al., 2011), que apresenta menor sensibilidade quando comparada ao método usado no presente trabalho (NOGUEIRA; DO ROSÁRIO et al., 2010)

Estudos mostram que o aurapteno é uma cumarina que apresenta toxicidade em diferentes testes, como na proliferação de células L1210 provenientes de leucemia murina (MO et al., 2000), atividade antifúngica para *Cryptococcus gattii* (JOHANN et al., 2011) e contra promastigotas de *Leishmania major* (NAPOLITANO et al., 2004) sendo essa toxicidade atribuída pelos autores a presença da porção prenilada.

Com relação ao poligaleno, nenhum estudo avaliou a atividade antiplasmodial ou toxicidade dessa cumarina, anteriormente. No entanto, os resultados encontrados são corroborados por estudos que demonstram atividade antiplasmodial de cumarinas contra cepas sensíveis e resistentes à cloroquina (MOON et al., 2011; DASTAN et al., 2012; PATEL et al., 2012; ABBAS, SYAFRUDDIN, 2014). Alguns propõem o mecanismo de ação por meio de estudos *in silico* que apontam para inibição de enzimas como a falcipaina-2 (PDB ID: 3BPF) (HIMANGINI et al., 2018) e DNA girase (YADAV et al., 2018).

2.3.2 Triagem virtual inversa

Ao avaliar a energia de afinidade (EA) das cumarinas com os alvos da base do BRAMMT, observou-se que o menor valor de EA, para o aurapteno e o poligaleno, foi para o código do *Protein Data Bank* (PDB): estrutura cristalográfica 3PHC com -9,8 kcal/mol e 1TV5 com -10,10 kcal/mol, respectivamente (Tabela 2).

A purina nucleosídeo fosforilase de *P. falciparum* (PfPNP) (PDB: 3PHC) que converte a 5'-metiltioinosina em hipoxantina para seguinte conversão em monofosfato de inosina (IMP),

um precursor na síntese das purinas necessárias para o *P. falciparum*. Dessa forma, a inibição de PfPNP tem o potencial de interromper a rota de recuperação de purina, bloqueando a formação de hipoxantina e, assim, interfere no metabolismo de poliamina, impedindo a síntese de nucleotídeos, cofatores e ácidos nucleicos (CASSERA et al., 2011).

Tabela 2 - Valor da energia de afinidade (EA) do aurapteno e do poligaleno frente aos alvos do banco BRAMMT

Ligante	Aurapteno Poligaleno		Ligante	Aurapteno Poligaleno		Ligante	Aurapteno Poligaleno	
	EA			EA			EA	
1LF3	-7,50	-7,30	2PML	-8,50	-8,60	3QS1	-8,20	-7,80
1LYX	-6,80	-5,70	2Q8Z	-8,00	-5,90	3T64	-7,50	-7,40
1NHW	-8,70	-8,70	2VFA	-7,40	-6,70	4B1B	-9,10	-8,70
1O5X	-5,10	-5,90	2VN1	-8,50	-8,10	4C81	-6,20	-6,50
1QNG	-7,60	-6,70	2YOG	-8,90	-7,50	4J56	-9,20	-7,40
1RL4	-6,10	-6,60	3AZB	-0,20	-0,40	4N0Z	-5,60	-6,00
1TV5	-9,50	-10,10	3BPF	-6,50	-6,90	4P7S	-6,40	-6,20
1U4O	-7,10	-7,20	3CLV	-8,10	-8,30	4QOX	-8,30	-8,70
1YWG	-6,50	-7,50	3FNU	-8,20	-7,90	PfATP6	-7,70	-8,00
2AAW	-7,00	-6,60	3K7Y	-7,50	-7,20	PfHT	-7,90	-7,40
2ANL	-6,90	-7,70	3N3M	-8,20	-5,80	PfNMT	-8,40	-8,80
2OK8	-5,40	-6,00	3PHC	-9,80	-5,10	-	-	-

Os valores de energia de afinidade são dados em kcal/mol.

O IMP corresponde ao ligante cristalográfico do 3PHC no PDB. Avaliando o padrão de interação intermolecular no sítio de ligação, observa-se que o IMP interage com os resíduos de His7, Arg45, Glu182 por ligações de hidrogênio através da interação de oxigênios e hidrogênios, e através de ponte salina entre o grupo ácido carboxílico da Glu184 e a amina terciária do anel pirrol do ligante cristalográfico (Figura 2A). Já o aurapteno interage por interação hidrofóbica com os resíduos Trp212, Tyr160, Pro209, Leu179 e Val181 tanto no anel aromático, como na porção prenilada, e por ponte salina através de interações do tipo cátion- π entre os grupos guanidino da Arg45, Arg27, Arg88 e o anel pirona do aurapteno, enquanto que os resíduos Ser91 e Gly23 interagem com a carbonila do anel cumarínico por ligações de hidrogênio (Figura 2B).

Em estudos realizados por Cassera et al. (2011) com curcumina, que teve sua atividade antimalárica atribuída a inibição da PfPNP, os autores descrevem a interação da substância através de ligações peptídicas com os resíduos de Ser91, Cys92 e Gly93 da cadeia b5 e Val181, Glu182 e Met183 da cadeia b10, e interações hidrofóbicas com os resíduos de Tyr160, Met183, Pro209 e Trp212, ligações de hidrogênio com Asp206, Trp212, Glu184, His7, além de ligações de fosfato com os resíduos de Gly23 e cadeias laterais de Arg27, Arg45, Arg88 e Ser91. Já Singh e Dwivedi (2016) afirmam que a interação da curcumina se dá nos resíduos Arg27, Arg88, Ser91, Gly93, Tyr160, Val181, Glu182, Met183, Glu184 e Asp206.

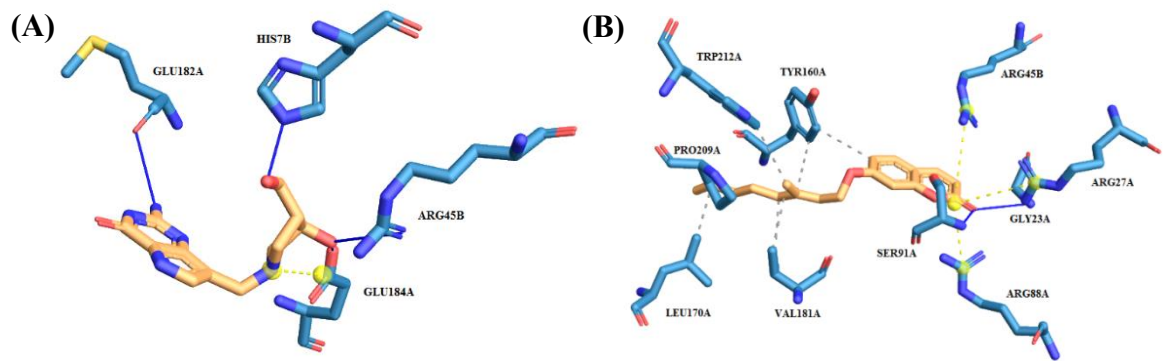


Figura 2 – Interação intermolecular entre IMP (A) e aurapteno (B) no sítio de ligação PfPNP. As linhas sólidas azuis representam a ligação de hidrogênio, enquanto as linhas tracejadas representam interações hidrofóbicas e as linhas tracejadas amarelas representam a ponte salina por π -cátion.

Comparando esses dados com o aurapteno, observa-se que existem interações em comum, a exemplo das interações com Trp212, Tyr160, Pro209, Val181, Arg45, Arg27, Arg88, Ser91 e Gly23 descritas no trabalho de Cassera, e Arg27, Arg88, Val181 e Tyr160 mostradas no estudo de Singh e Dwivedi, o que evidencia que esses resíduos são importantes no sítio catalítico da enzima, visto que a curcumina teve comprovada sua atividade *in vitro* e *in vivo*.

A diidroorotato desidrogenase de *P. falciparum* (PfdHODH) (PDB: 1TV5) catalisa a biossíntese de orotato a partir do diidroorotato pela via metabólica da síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina, usada para sintetizar DNA, RNA e co-fatores importantes para *P. falciparum*.

O ligante cristalográfico desta enzima no PDB corresponde à teriflunomida. Avaliando a Figura 3A, observa-se interações do tipo hidrofóbicas, com os resíduos Ile263, His185, Phe188, Arg 265, Val532 e Leu 172. Por outro lado, o poligaleno interage através de interações hidrofóbicas com os resíduos Val532, Phe227 e His185, além de formar ponte salina com Arg265 (Figura 3B).

De acordo com Hoelz et al. (2018) algumas interações são importantes para garantir a inibição da PfdHODH. Destaca-se a interação por ligações de hidrogênio com o resíduo de His185, porém com alguns ligantes também ocorrem interações com Arg265, Tyr528 e Arg135. Também foram relatadas pontes salina com Arg265. Interações hidrofóbicas ocorrem com os resíduos de Phe227, Gly181, Leu176, Cys175, Val532, Gly535, Leu189, Met536, Ileu237, Phe 171, Leu240 e Leu197, bem como com os resíduos de Leu172, Cys184, Phe188, Ile263 e Leu531 que contribuem para a bolsa de ligação ao inibidor.

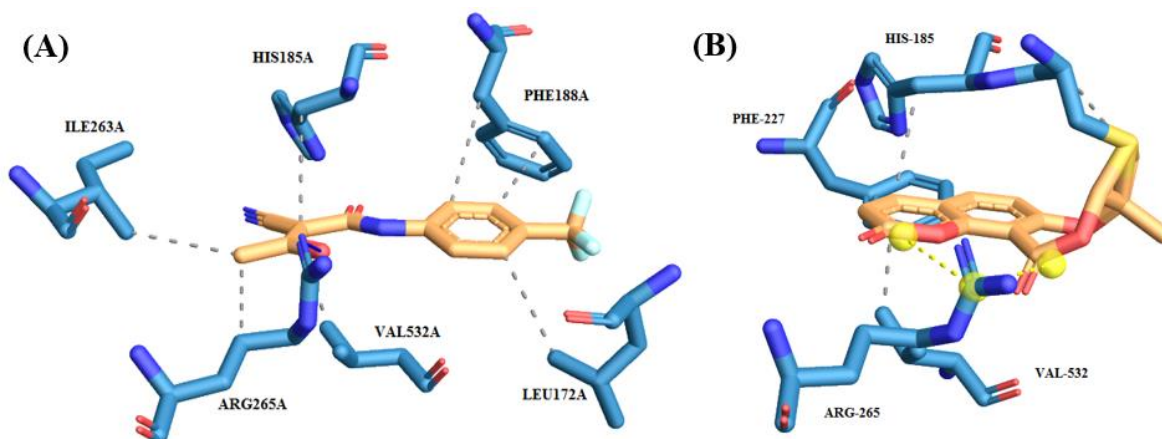


Figura 3 – Interação intermolecular entre teriflunomida (A) e poligaleno (B) no sítio de ligação de PfDHODH

As linhas tracejadas cinza representam interações hidrofóbicas e as linhas tracejadas amarelas representam a ponte salina por π -cátion.

Comparando com o poligaleno, nota-se a similaridade das interações do tipo ponte salina com Arg265 e interações hidrofóbicas com Val532 e Phe227. O resíduo His185 comumente interage através de ligações de hidrogênio, mas no caso do poligaleno são observadas interações hidrofóbicas. Esses são importantes resíduos na interação entre o ligante e a enzima, demonstrando assim o potencial do poligaleno como inibidor da PfDHODH.

2.4 Conclusão

Este é o primeiro relato científico do isolamento do aurapteno de *Polygala boliviensis*, e também o primeiro relato da atividade antiplasmódica *in vitro* das cumarinas aurapteno e poligaleno.

Abordagens baseadas na estrutura, como *docking* molecular, sugerem que o possível mecanismo de ação do aurapteno está relacionado à inibição da enzima purina nucleosídeo fosforilase e que o poligaleno atua na diidroorotato desidrogenase de *P. falciparum* e mostram que esses compostos são capazes de interagir com as proteínas, estabelecendo interações com resíduos-chave no sítio ativo, o que é essencial para a inibição enzimática.

Assim, a presente pesquisa mostra que *P. boliviensis* apresenta cumarinas com potencial antimalárico, reforçando o potencial medicinal da flora do semi-árido brasileiro.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, J.; SYAFRUNDDIN, S. Antiplasmodial evaluation of one compound from *Calophyllum flavoranulum*. **Indonesian Journal of Chemistry**, v. 2, p. 185-191, 2014.
- BRANDON, C. J. et al. An approach to creating a more realistic working model from a protein data bank entry. **Journal of Molecular Modeling**, v. 21, p. 3, 2015.

CASSERA, M.B. et al., *Plasmodium falciparum* parasites are killed by a transition state analogue of purine nucleoside phosphorylase in a primate animal model. **Plos One**, v.6, p.1-12, 2011.

CHEMAXON. **MarvinSketch version 5.12.1**. [S.l]: ChemAxon, [2013?].

COELHO, V.P.M; AGRA, M.F.; BARACHO, G.S. Flora da Paraíba, Brasil: *Polygala* L. (Polygalaceae). **Acta Botânica Brasilica**, v. 22, p. 225-239, 2008.

CROWTHER, G.J. et al. Identification of inhibitors for putative malaria drug targets among novel antimalarial compounds. **Molecular and Biochemical Parasitology**. V.175, p. 21-29, 2011.

DAO, T.T. et al. Xanthonenes from *Polygala karensium* inhibit neuraminidases from influenza A viruses. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 3688–3692, 2012.

DASTAN, D. et al. Disesquiterpene and sesquiterpene coumarins from *Fresula pseudalliacea*, and determination of their absolute configurations. **Phytochemistry**, v.78, p. 170-178, 2012.

DENIZOT, F., LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal Immunological Methods**. v. 89, p. 271-277, 1986.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, p. 3219-3228, 1980.

GUIGUEMDE, W.A. et al. Global Phenotypic Screening for Antimalarials. **Chemistry & Biology**, v. 19, p. 116–129, 2012.

HAMBURGER, M.; GUPTA, M.; HOSTETTMANN, K. Coumarins from *Polygala paniculata*. **Planta Medica**, v. 51, p. 215-217, 1985.

HIMINGINI et al. Designing novel inhibitors against falcipain-2 of *Plasmodium falciparum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, p. 1566-1569, 2018.

HOELZ, L.V. et al. (2018). *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase: A drug target against malaria. **Future Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 1853-1874, 2018.

HU, X. L. et al. Recent development of coumarin derivatives as potential antiplasmodial and antimalarial agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, p.114-123, 2018.

JOHANN, S. et al. Antifungal activity of five species of *Polygala*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1065-1075, 2011.

KATSUNO, K. et al. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, p. 751-758, 2015.

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J.P., Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **Journal of Parasitology**, v. 65, p. 418–20, 1979.

LAPHOOKHIEIO, S. et al. Chemical Constituents from *Aegle marmelos*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 176-178, 2011.

- LUNEV, S. et al. Oligomeric interfaces as a tool in drug discovery: Specific interference with activity of malate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum* *in vitro*. **Plos One**, v.13, p. 1-22, 2018.
- MAIA, E. et al. Octopus: a platform for the virtual high-throughput screening of a pool of compounds against a set of molecular targets. **Journal of Molecular Modeling**, v. 23, p. 26, 2017.
- MATSUZAKI, W. S. et al. Uso de teste de químio-sensibilidade para escolha da quimioterapia adjuvante no câncer gástrico avançado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. v.33, p. 228-234, 2006
- MO, H. et al. Farnesyl anthranilate suppresses the growth, *in vitro* and *in vivo*, of murine B16 melanomas. **Cancer Letters**, v.157, p. 145-153, 2000.
- MOON, H.I. et al. Antiplasmodial and cytotoxic activity of coumarin derivatives from dried roots of *Angelica gigas* Nakai *in vitro*. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 33, p. 663-666, 2011.
- NAPOLITANO, H.B. et al. Aurapten, a coumarin with growth inhibition against *Leishmania major* promastigotes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1847-1852, 2004.
- NOGUEIRA, F.; DO ROSÁRIO, V.E. Métodos para avaliação da atividade antimalárica nas diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium*. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, p. 109-124., 2010.
- NUNES, R. R. et al. Successful application of virtual screening and molecular dynamics simulations against antimalarial molecular targets. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, p. 721-730, 2016.
- PATEL, K. et al., Design, synthesis and biological evaluation of some novel 3-cinnamoyl-4-hydroxy-2H-chromen-2-ones as antimalarial agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, p. 1780–1784, 2012.
- PATRA, N. et al. A novel epoxypropoxy flavonoid derivative and topoisomerase II inhibitor, MHY336, induces apoptosis in prostate cancer cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 658, p. 98–107, 2011.
- PAUL, S.M. et al. *In vitro* and *in vivo* studies demonstrate anticancer property of root extract of *Polygala senega*. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 3, p. 188–196, 2010.
- PENA-COUTINHO, J. et al. Antimalarial Activity of Potential Inhibitors of *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase Enzyme Selected by Docking Studies. **Plos One**, v.6, p. 1-7, 2011.
- PEREIRA, J. R. et al. Cytotoxicity evaluation of marine alkaloid analogues of viscosaline and theonelladin C. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2. p. 145–148, 2012.
- PIZZOLATTI, M.G. et al. Trypanocidal activity of coumarins and styryl-2-pyrones from *Polygala sabulosa* A.W. Bennett (Polygalaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.177-182, 2008.

SALENTIN, S. et al. **PLIP**: fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucl. Acids Res.* (1 July 2015) 43 (W1): W443-W447. doi: 10.1093/nar/gkv315.

SILVA, D.F. et al. Poligalen, a new coumarin from *Polygala boliviensis*, reduces the release of TNF and IL-6 independent of NF- κ B downregulation. **Fitoterapia**, v. 113, p. 139-143, 2016.

SINGH, D.B.; DWIVEDI, S. Structural insight into binding mode of inhibitor with SAHH of *Plasmodium* and human: interaction of curcumin with anti-malarial drug targets. **Journal of Chemical Biology**, v. 9, p. 107–120, 2016.

TIZZIANI, T. et al., Antitumor screening of crude extracts of ten medicinal plants of *Polygala* genus from Southern Brazil. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, p. 79-83, 2017.

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

TRAGER, W.; JENSEN, J.B. **Human Malaria in Continous Culture**, v. 193, p. 673–675, 1976.

TRIPOS, L. P. **SYBYL-X, versão 2.0**. [S. l.]: Molecular Silverware copyright © 1990 Rohm and Haas Company, 2011. Conjunto de programas. 1 CD-ROM.

XIANJIN, X.; MARSHAL, H.; XIAOQIN, Z. Docking-based inverse virtual screening: methods, applications, and challenges. **Biophysics reports**, v. 4, p. 1-16.17, 2018.

YADAV, N. et al. *In vitro* antiplasmodial efficacy of synthetic coumarin-triazole analogs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 145, p. 735-745, 2018.

CAPÍTULO 3

Variação sazonal da composição química e das atividades biológicas de *Polygala boliviensis* A.W. Benn (Polygalaceae)

CAPÍTULO 3: Variação sazonal da composição química e das atividades biológicas de *Polygala boliviensis* A.W. Benn (Polygalaceae)

Resumo

Espécies do gênero *Polygala* são utilizadas popularmente em diferentes partes do mundo, inclusive no nordeste brasileiro, onde predomina o clima semiárido e o bioma caatinga. Essa região apresenta períodos chuvosos e secos, implicando em forte variação climática que pode alterar a produção dos metabólitos secundários nos vegetais. A *Polygala boliviensis* é encontrada nos domínios da caatinga, e alguns estudos mostram potencial fitoterapêutico da espécie. Dessa forma, considerando que a sazonalidade pode influenciar no metabolismo vegetal e, conseqüentemente, na atividade biológica de extratos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química e atividades biológicas de *P. boliviensis* nas estações seca e chuvosa. Para isso, as coletas foram realizadas em agosto e novembro, nos anos de 2016, 2017 e 2018. Os extratos foram obtidos por maceração com metanol e submetidos à análise do perfil químico, identificação e quantificação dos componentes por CLAE-DAD. Para avaliação biológica, foram realizados os testes do sequestro do radical livre DPPH•, inibição da auto oxidação do β -caroteno e letalidade frente à *Artemia salina*. A correlação de Pearson e HCA foram utilizadas para avaliar a relação entre a composição química, atividades biológicas, elementos climáticos e períodos de coleta. Como resultado, foi observado que o rendimento e perfil químico dos extratos por CLAE-DAD não foram alterados com o período de coleta, porém foram observadas variações quantitativas. Nas amostras de 2017 foi identificado o ácido gálico, enquanto rutina, poligaleno, aurapteno e mais 7 picos majoritários desconhecidos (D1-D7) foram identificados em todas as amostras. A correlação de Pearson indicou uma ou mais correlações significativas entre os elementos climáticos e a produção de metabólitos. Também foi observado que o maior teor de D1 aumenta a atividade antioxidante pelo teste de sequestro do radical livre DPPH•; de D4, D5 e D7, o teste de inibição da auto oxidação do β -caroteno; e de D1, D2, D3 e D6, a letalidade frente à *A. salina*. Além disso, a HCA mostrou que o período seco apresenta maiores teores de poligaleno e D3, em contapartida o período chuvoso demonstra maior produção de D4 e D6, menor atividade antioxidante pelo teste de sequestro do radical livre DPPH• e maior letalidade frente à *A. salina*. Esse estudo contribui com a caracterização química de *P. boliviensis*, tendo em vista que é o primeiro relato de ácido gálico e rutina nesta espécie. Além disso, permite concluir que os elementos climáticos e a sazonalidade influenciam na composição química e atividades biológicas dos extratos avaliados. Assim, o conhecimento dessa influência serve como base para estudos que visem o desenvolvimento de produtos fitoterapêuticos com *P. boliviensis*, facilitando a determinação do período de coleta ou condições ideais de cultivo para a espécie, de acordo com a finalidade pretendida.

Palavras-chave: CLAE-DAD. Metabolismo secundário. Sazonalidade. Semiárido brasileiro.

Abstract

Plants from species of the *Polygala* genus are popularly used in different parts of the world, including the Northeast region of Brazil. This region presents, predominantly, Caatinga biome and semiarid climate, with rainy and dry seasons that result in strong climatic variations that can change the production of secondary metabolites in plants. Some studies have shown that *Polygala boliviensis*, which is a plant species found in the Caatinga biome, has phytotherapeutic potential. Thus, considering that the seasonality can affect the plant metabolism and, consequently, the biological activity of extracts, the objective of this work was to evaluate the chemical composition and biological activity of *P. boliviensis* in the dry and rainy seasons.

Collections were carried out in August and November 2016, 2017, and 2018. The extracts were obtained by maceration with methanol and subjected to chemical analysis, identification, and quantification of components by the high-performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD) method. The biological evaluation was carried out using DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical sequestration test, β -carotene auto oxidation inhibition test, and *Artemia salina* lethality test. Pearson's correlation and hierarchical cluster analysis (HCA) were used to evaluate the correlations between chemical composition, biological activity, climatic elements, and collection times. The yield and chemical profile of the extracts evaluated by the HPLC-DAD did not change due to the collection time; however, quantitative variations were observed. Gallic acid was found in the samples of 2017, and rutin, polygalin, auraptene, and 7 other major unknown peaks (D1-D7) were found in all samples. The Pearson's correlation indicated one or more significant correlations between climatic elements and metabolite productions. The antioxidant activity increased by the highest contents of D1 in the DPPH• sequestration test; of D4, D5, and D7 in the β -carotene auto oxidation inhibition test; and of D1, D2, D3, and D6 in the *Artemia salina* lethality test. In addition, the HCA showed that the dry season presented higher polygalin and D3 contents, whereas the rainy season presented higher D4 and D6 contents, lower antioxidant activity by the DPPH• sequestration test, and higher lethality to *A. salina*. This study contributes for the chemical characterization of *P. boliviensis*, since it is the first report of gallic acid and rutin in this species. In addition, it allows the conclusion that climatic elements and seasonality affect the chemical composition and biological activity of the extracts evaluated. Information on this effect may serve as a base for studies focused on the development of phytotherapeutic products using *P. boliviensis*, and facilitate the determination of the ideal collection time and growth conditions for this species, according to the intended purpose.

Keywords: HPLC-DAD. Secondary metabolism. Seasonality. Brazilian semiarid.

3.1 Introdução

A família Polygalaceae apresenta cerca de 1000 espécies, 20 gêneros e três tribos, sendo o gênero *Polygala* o mais representativo. Espécies desse gênero são utilizadas popularmente, principalmente para infamação, problemas cardiovasculares e distúrbios do sistema nervoso central, o que as torna fonte de interesse para o desenvolvimento de novos produtos fitoterapêuticos. Além disso, estudos fitoquímicos indicam a presença de metabólitos secundários como triterpenos, saponinas, xantonas, oligossacarídeos, lignanas e outros fenólicos (LACAÏLLE-DUBOIS, DELAUDE, MITAINE-OFFER, 2020).

Os metabólitos secundários são produzidos como resposta adaptativa das plantas às mudanças que ocorrem no desenvolvimento desses vegetais, o que inclui fatores bióticos e abióticos (ISAH, 2019). De acordo com Verma e Shukla (2015), dentre os fatores abióticos, pode-se citar estresse hídrico, provocado pela seca; salínico, por temperatura; por radiação; variação sazonal, entre outros. Esses fatores são importantes, principalmente, em locais de clima semiárido, como na caatinga.

O bioma caatinga é exclusivamente brasileiro, estando presente em vários estados do Nordeste do país. Apresenta clima tropical quente e seco, do tipo semiárido, com altas

temperaturas e baixo índice pluviométrico (FREIRE et al., 2020). Embora no ambiente do semiárido as estações do ano não sejam bem definidas, dois períodos são característicos: o período chuvoso, que ocorre no primeiro semestre, e a estação mais seca, entre os meses de agosto a outubro. Essa variação implica na baixa precipitação durante o ano e acarreta em déficit hídrico de pelo menos 70% (MARENGO et al., 2012).

A variação climática na região do semiárido é um aspecto que deve ser considerado para o manejo das espécies de interesse, pois pode acarretar na variação da produção de metabólitos secundários, responsáveis pelas propriedades terapêuticas dos vegetais (CHAVES et al., 2013). Pessoas que vivem nessa região utilizam os recursos vegetais para tratamento de sintomas e doenças, incluindo espécies do gênero *Polygala*, como *Polygala gracilis*, *P. martiana*, *P. paniculata*, *P. violaceae* e *P. spectabilis* (AGRA, FREITAS, BARBOSA-FILHO, 2007).

A *Polygala boliviensis* A. W. Benn (Polygalaceae) é encontrada nos domínios fitogeográficos da Caatinga e Mata Atlântica (PASTORE et al., 2015). Para a referida espécie já foram descritos relatos de atividade contra *Staphylococcus epidermidis* (TRETIN et al., 2011), *Pseudomonas aeruginosa* (TRETIN et al., 2014), *Ralstonia solanacearum* (MALAFAIA et al., 2018), além da quantificação de salicilato de metila (ROCHA et al., 2012), identificação da cumarina poligaleno, com atividade imunomoduladora (SILVA et al., 2016), e efeito antiedematogênico e antinociceptivo *in vivo* (ROCHA et al., 2019).

Estudos prévios demonstraram ainda que a *P. boliviensis* apresentou atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH• e toxicidade pelo teste de letalidade frente à *Artemia salina* (SILVA, 2015). Esses são testes *in vitro* simples, de baixo custo, e rápidos, desenvolvidos comumente em laboratório de produtos naturais, sendo, por isso, metodologias relevantes para estudo da variação sazonal de atividades biológicas.

Considerando que a sazonalidade pode influenciar na produção dos metabólitos secundários pelas plantas e, conseqüentemente, variação na atividade biológica de extratos vegetais, esse estudo teve como objetivo avaliar a alteração na composição química dos extratos de *Polygala boliviensis*, bem como da atividade antioxidante e letalidade frente à *Artemia salina*, em diferentes períodos de coleta, sendo um na estação chuvosa e outro na estação seca.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Coleta e preparo dos extratos

As coletas da espécie *Polygala boliviensis* foram realizadas no *campus* da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, Bahia (12°16'00"S e 38°58'00"W), que está localizado numa zona climaticamente intermediária entre a zona úmida do litoral e o semiárido baiano.

Nessa localidade, o maior período chuvoso se encontra entre abril e julho (quadra chuvosa), e o período mais seco se dá entre agosto e outubro. Existe ainda um período de chuvas de verão, entre novembro e janeiro, e um novo período seco, que antecede a estação chuvosa, nos meses de fevereiro e março (DINIZ, SANTOS, SANTO, 2008).

Como *P. boliviensis* se encontra no estágio de floração entre maio e novembro, estabeleceu-se os meses de agosto e novembro como período de coleta, pois são os meses subsequentes a quadra chuvosa e ao período mais seco. Assim, as coletas foram realizadas em agosto e novembro de 2016, 2017 e 2018, pela manhã.

A identificação do material foi realizada em comparação com a exsicata depositada no herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), com voucher de número HUEFS168956, pelo botânico José Floriano Bârea Pastore.

As partes aéreas e raízes foram secas em estufa a $45 \pm 3^\circ\text{C}$, até peso constante, pulverizadas em liquidificador industrial, e submetidas a cinco macerações com metanol, por cinco dias cada. O extrato obtido foi concentrado em evaporador rotativo, utilizando temperatura do banho de $60 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.2.2 Análise do perfil químico por CLAE-DAD

Os extratos foram avaliados por cromatografia a líquidos de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) para comparação da composição química, bem como detecção de padrões comerciais (ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido salicílico, ácido *trans*-ferúlico, catequina, camferide, camferol, nariginina, propilgalato, quercetina, rutina, vanilina) e das únicas substâncias isoladas e identificadas, até então, em estudos prévios para a espécie, poligaleno e aurapteno (SILVA, 2015).

A identificação das substâncias foi realizada comparando o tempo de retenção e espectros no UV dos picos no cromatograma dos padrões, com os das amostras. Além disso, foram determinados os picos majoritários de substâncias desconhecidas, considerando a área mínima do pico de 200 mAu.sec, altura do pico de 15 mAu e pureza, assim os picos que não satisfaziam a essas condições, foram desconsiderados. Dos picos selecionados, foram avaliados os espectros no UV para sugerir a classe metabólica.

As amostras foram dissolvidas em metanol grau HPLC (10 mg/mL) e submetidas à técnica de *clean-up* com cartucho de extração de fase sólida C18, 6 mL, 1000 mg (Cleanert®), para retenção dos interferentes. O cartucho foi previamente condicionado com 9 mL de metanol grau HPLC e, em seguida, 3 mL das amostras foram submetidas ao cartucho e eluídas com pressão positiva, utilizando bomba de pressão. Para os padrões comerciais e substâncias

isoladas foram preparadas soluções em metanol grau HPLC (1 mg/mL). Todas as amostras foram filtradas com filtros de membrana de éster de celulose 0,45 μm (Millipore®).

A análise cromatográfica foi realizada no cromatógrafo Varian HPLC, consistindo em bomba Varian Polaris, detector de arranjo de diodos Varian ProStar e injetor manual. Foi utilizada coluna LiChroCART Purospher StaR® RP8-e (250 mm x 4,6 mm i.d.) (5 μm) (Merck®, Darmstadt, Germany) combinada com pré-coluna apropriada da Merck®. As condições cromatográficas incluíram: volume de injeção de 20 μL , faixa de comprimento de onda de 200-600 nm e aquisição cromatográfica em 280 nm, considerando o número de picos e a resolução. A fase móvel foi composta de água ultrapurificada (A) e metanol grau HPLC (B) em sistema de gradiente, com fluxo de 0,8 mL/min. O gradiente de eluição aplicado foi: 0-3 min, 70% A; 3-8 min, 70-60% A; 8-20 min, 60-55% A; 20-30 min, 55-45 %A; 30-40 min, 45-30% A; 40-50 min, 30-0% A; 50-60 min 100%B.

3.2.3 Quantificação das substâncias identificadas por CLAE-DAD

Soluções estoque dos padrões rotina (6 mg/mL), poligaleno e aurapteno (1 mg/mL), foram preparadas em metanol grau HPLC e filtradas com filtros de membrana de éster de celulose 0,45 μm (Millipore®). A partir destas soluções, foram feitas diluições, obtendo-se cinco soluções com diferentes concentrações para elaboração das curvas de calibração, sendo estas entre 50 a 2000 $\mu\text{g/mL}$ para rotina, 40 a 180 $\mu\text{g/mL}$ para o poligaleno, e 10 a 150 $\mu\text{g/mL}$ para o aurapteno.

3.2.4 Validação do método de quantificação

O método foi validado de acordo com as diretrizes do *International Conference on Harmonization* (ICH) (ICH, 1995a; ICH,1995b). Os parâmetros analisados foram intervalo, seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez. A seletividade foi avaliada pela comparação dos tempos de retenção (tR) e bandas de absorção obtidas nos espectros no UV dos padrões e amostras; a linearidade através dos valores do coeficiente de correlação (r); a precisão pelo desvio padrão relativo (DPR) de três concentrações diferentes (baixa, média, alta) em triplicata; exatidão pela adição de padrão nas amostras, em três concentrações diferentes (baixa, média, alta) e em triplicata; LD e LQ pelas fórmulas $\text{DPb} \times 3/a$ e $\text{DPb} \times 10/a$, respectivamente, em que DPb é o desvio padrão do coeficiente linear das equações da reta, quando “x” é zero, e “a” é o coeficiente angular, ou inclinação da reta; e a robustez foi avaliada alterando o fluxo e a fase móvel.

3.2.5 Quantidade relativa das substâncias

Para calcular a quantidade relativa das substâncias (QRS) nos extratos de *P. boliviensis*, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$QRS = \frac{\text{área do pico da substância}}{\sum \text{áreas dos picos de todas as substâncias}} \times 100 (\%).$$

3.2.6 Avaliação das atividades biológicas

Os extratos foram codificados levando em consideração a espécie *Polygala boliviensis* (PB); o mês de coleta, sendo “A” para agosto e “N” para novembro; e os anos, resultando nos seguintes códigos: PBA2016, PBN2016, PBA2017, PBN2017, PBA2018 e PBN2018.

3.2.6.1 Teste do sequestro do radical livre DPPH•

O teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Malterud et al. (1993) adaptada. Para os extratos, foram preparadas soluções estoque (40 mg/mL) que, em seguida, foram diluídas, obtendo-se cinco soluções de diferentes concentrações para a determinação da concentração efetiva para sequestro de 50% dos radicais livres (CE₅₀). As concentrações variaram entre 2 a 16 mg/mL para PBA2016; 2 a 18 mg/mL para PBN2016; 4 a 28 mg/mL para PBA2017 e PBN2017; e 1 a 30 mg/mL para PBA2018 e PBN2018. O padrão utilizado foi o propilgalato na concentração de 5 mg/mL, garantindo assim 100% de sequestro dos radicais livres DPPH•, para aplicação na fórmula. No entanto, também foi determinada a CE₅₀ do propilgalato, utilizando cinco concentrações entre 0,75 e 4,5 mg/mL, para comparação com as amostras. As amostras e padrões foram dissolvidos em metanol.

Foram utilizadas microplacas de 96 poços. A cada poço adicionou-se 250 µL da solução de DPPH• (45 µg/mL), e realizou-se a análise em leitor Multiskan™ GO, λ = 517 nm. Em seguida, as alíquotas de 4,2 µL das amostras foram adicionadas aos poços e incubadas, por 15 minutos, à temperatura ambiente e protegidos da luz, sendo realizada nova leitura após esse período. A porcentagem do sequestro do radical livre DPPH• (%SRL) foi calculada pela fórmula:

$$\% SRL = \frac{100(A0 - Af)}{(A0p - Ap)}$$

Em que A0 = absorvância inicial da solução de DPPH•; Af = absorvância final da amostra após reação de 15 minutos com DPPH•; A0p = absorvância inicial do padrão e Ap = absorvância final do padrão após reação de 15 minutos com DPPH•. O controle negativo foi preparado substituindo a amostra pelo mesmo volume de metanol e o teste foi realizado em triplicata.

3.2.6.2 Inibição da auto oxidação do β -caroteno

O teste foi realizado conforme metodologia descrita por Hidalgo et al. (1994) com adaptações. Os extratos foram testados em soluções etanólicas de 10 mg/mL e o padrão propilgalato na concentração de 1 mg/mL. Para o preparo do meio oxidante, 10 mg do β -caroteno foram dissolvidos em 1 mL de clorofórmio. Em seguida, foi adicionada uma gota de ácido linoleico e 0,4 mL do emulsificador Tween 40. Essa mistura foi levada ao evaporador rotativo para retirada do clorofórmio e, então, adicionados 100 mL de água destilada, seguido de agitação, para promover a aeração.

Foram utilizadas microplacas de 96 poços. Adicionou-se 250 μ L do meio oxidante nos poços das microplacas e 10 μ L das amostras ou padrão. A primeira leitura foi considerada como o tempo zero e foram feitas leituras a cada 10 min até o tempo 60 minutos no leitor MultiskanTM GO, sendo utilizado o comprimento de onda de 470 nm. A inibição da auto oxidação do β -caroteno foi expressa em porcentagem e calculada de acordo com a fórmula:

$$\%In = 100 \times \frac{1 - (A_0 - A_f)}{(A_{0B} - A_{fB})}$$

Sendo que: A_0 = Absorbância inicial da amostra, A_f = Absorbância final da amostra, A_{0B} = Absorbância inicial do branco e A_{fB} = Absorbância final do branco. O branco foi preparado utilizando etanol e o teste foi realizado em triplicata.

3.2.6.3 Letalidade frente a *Artemia salina* (TAS)

O TAS foi baseado no método desenvolvido por Meyer et al. (1982) e adaptado por Serrano, Ortega e Villar (1996). Os extratos foram dissolvidos em acetona para preparo das soluções estoque na concentração de 5 mg/mL. Alíquotas diferentes foram retiradas para preparo das soluções em diferentes concentrações. A acetona foi evaporada em estufa a $60 \pm 1^\circ\text{C}$ e as amostras diluídas, em seguida, com 50 μ L de DMSO.

Os ovos do microcrustáceo *Artemia salina* foram incubados em aquário com água do mar artificial durante 24 horas. Após esse período, dez *nauplii* recém-eclodidos foram colocados em contato com as diferentes concentrações dos extratos, e o volume dos tubos, com as amostras + DMSO, foi completado para 5 mL de água do mar artificial, para obter as concentrações entre 1 e 300 $\mu\text{g/mL}$. Após 24 horas, os *nauplii* sobreviventes foram contados para a determinação da concentração responsável pela letalidade de 50% dos *nauplii* (CL_{50}). A porcentagem de letalidade frente à *A. salina* (%LAS) foi determinada segundo a fórmula:

$$\%LAS = \frac{(n^\circ \text{ de mortos no teste} - n^\circ \text{ de mortos no branco})}{n^\circ \text{ de sobreviventes no branco}} \times 100$$

Como controle negativo foi utilizado água do mar artificial com 50 μ L de DMSO. O

teste foi feito em triplicata.

3.2.7 Informações sobre as condições meteorológicas

Para análise da influência dos elementos climáticos na produção dos metabólitos secundários e atividades biológicas, foram utilizados os dados registrados pelo Instituto Meteorológico da UEFS, durante os meses de abril e outubro dos anos de 2016, 2017 e 2018 (Tabela 1).

Tabela 1 – Elementos climáticos referentes aos períodos de coleta da *P. boliviensis*

Período	Elementos climáticos			Umidade relativa mensal (%)	Acumulado Índice pluviométrico (mm)
	Temperatura mínima mensal (°C)	Temperatura máxima mensal (°C)	Temperatura média mensal (°C)		
*Chuvoso 2016	19,80±1,19	29,47±2,18	23,94±1,52	80,38±4,82	185,50
**Seco 2016	19,53±1,52	30,49±2,02	24,25±1,45	74,56±3,70	77,60
*Chuvoso 2017	19,71±1,69	28,39±2,42	23,52±1,87	84,27±3,06	205,70
**Seco 2017	18,74±0,78	28,80±2,02	23,11±1,11	79,14±3,62	89,20
*Chuvoso 2018	17,03±1,61	28,76±1,65	23,50±1,84	82,34±4,16	343,40
**Seco 2018	18,74±2,24	29,50±0,21	24,34±1,11	78,16±3,57	71,80

*Período chuvoso: abril a julho. **Período seco: agosto a outubro.

Fonte: Instituto Meteorológico da UEFS

3.2.8 Análise estatística

Para os cálculos de CE₅₀ no teste de sequestro do radical livre DPPH• e de CL₅₀ na letalidade frente à *Artemia salina*, foi utilizada a regressão linear, através do programa Microsoft® Excel® 2016 MSO, sendo considerados valores de $r \geq 0,99$.

Com o objetivo de comparar os rendimentos dos extratos, quantidade das substâncias nos extratos e resultados das atividades biológicas foi realizada ANOVA, seguida de Tukey ou Scott-Knott ($p \leq 0,05$), utilizando Sisvar versão 5.7 2018 e para comparação com padrões, teste Dunnett ($p \leq 0,05$) utilizando o GraphPad Prism 5 versão 5.01 2007.

A fim de se verificar as relações entre a composição química, atividades biológicas e elementos climáticos, procedeu-se teste de correlação de Pearson ($p \leq 0,05$) e análise de agrupamento hierárquico, com base na distância euclidiana, com auxílio dos pacotes *GGally* e *phatmap*, respectivamente, implementados no software R 4.0.0 2020.

3.3 Resultados

3.3.1 Rendimento e perfil químico dos extratos

O rendimento do extrato não foi prejudicado pelo período de coleta (Tabela 2), variando entre 19,92 e 32,03%. Estatisticamente, os dados não apresentaram diferença significativa pelo teste Tukey, considerando valores de $p \leq 0,05$.

Tabela 2 – Rendimento dos extratos de *P. boliviensis*

Amostra	Agosto			Novembro		
	2016	2017	2018	2016	2017	2018
Rendimento (%)	23,87	26,48	29,08	32,03	19,92	28,45
Média ± DP	26,48 ± 2,12 ^a			26,80 ± 5,08 ^a		

ANOVA, Teste Tukey ($p \leq 0,05$). Amostras identificadas com mesma letra não apresentam diferença estatística.

Analisando os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD (Figura 1), pode-se observar que não houve diferença significativa no perfil químico dos extratos, já que a maioria dos picos foi observada para todas as amostras, mantendo o mesmo padrão de separação, independente do período de coleta.

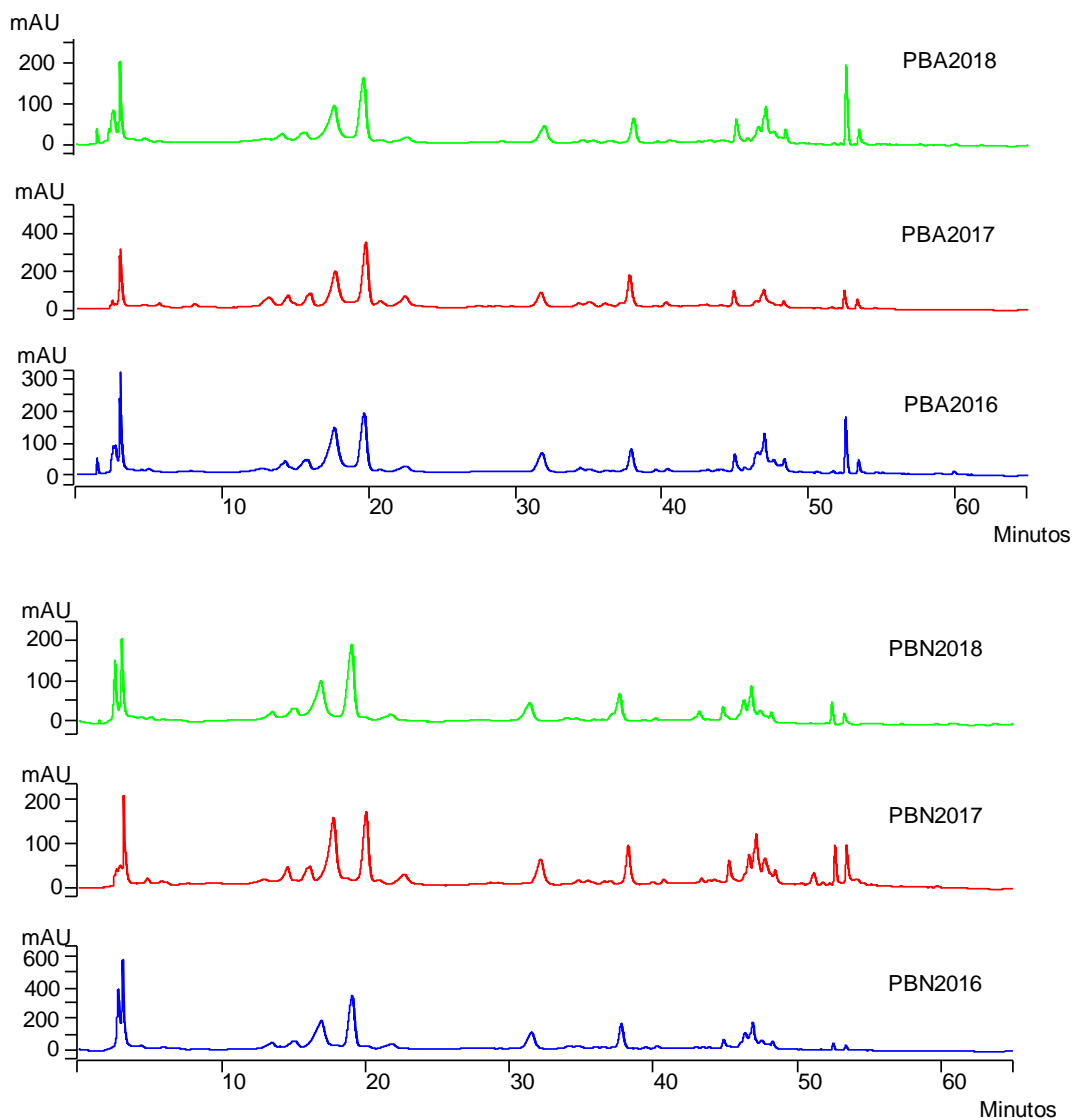


Figura 1 – Comparação dos cromatogramas dos extratos de *P. boliviensis* obtidos em diferentes períodos de coleta por CLAE-DAD (280 nm)
PBA: amostras de agosto. PBN: amostras de novembro

3.3.2 Identificação dos metabólitos secundários

Em todas as amostras foram identificadas as substâncias rutina, poligaleno e aurapteno, e apenas nas amostras de 2017, foi identificado o ácido gálico. Além disso, sete picos majoritários desconhecidos (D1 a D7) foram observados em todas as amostras (Figura 2, Tabela 3).

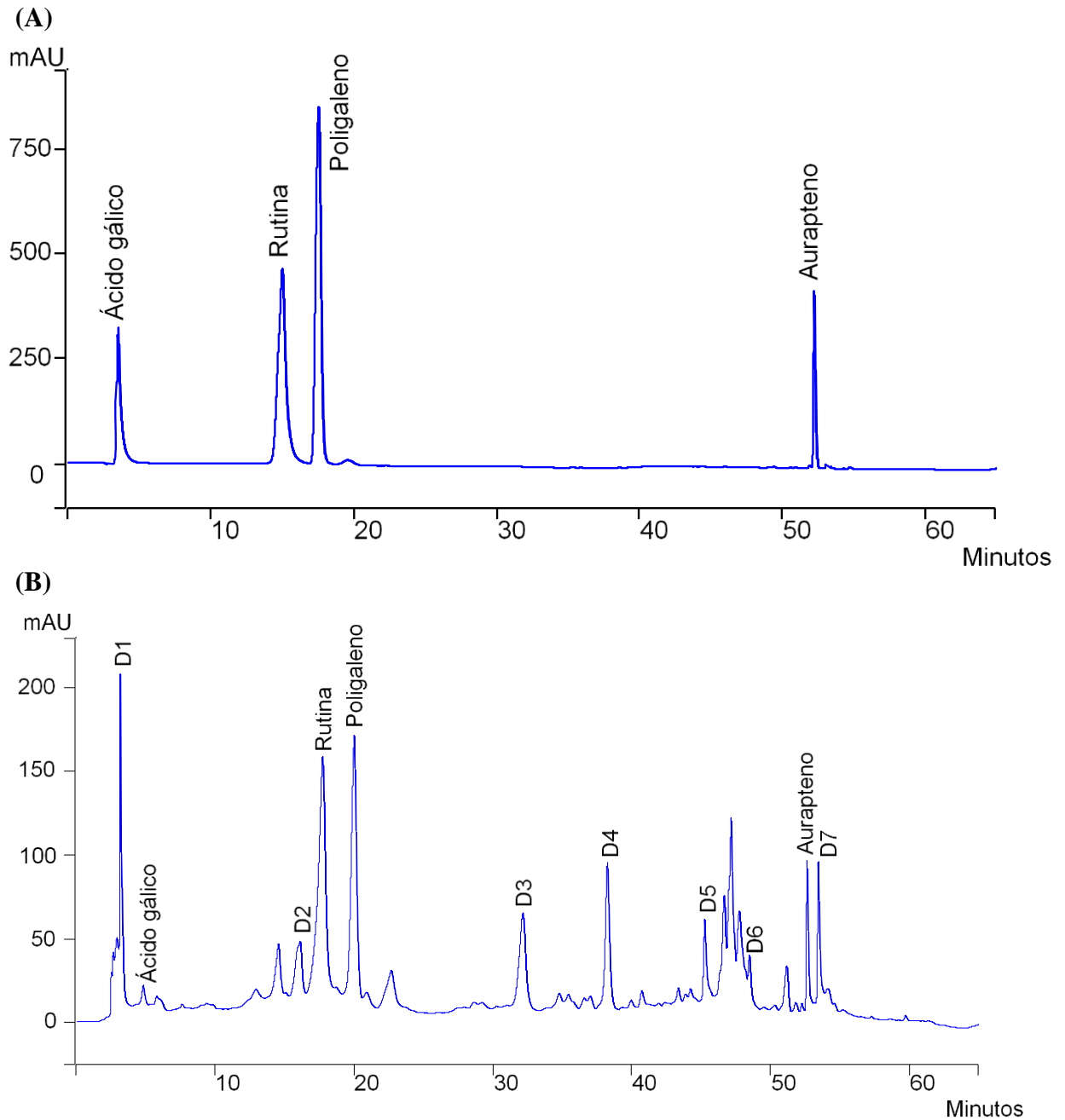


Figura 2 – Cromatograma dos padrões identificados (A) e da amostra PBN2017 (B) analisados por CLAE-DAD (280 nm)

D1-D7: substâncias desconhecidas

Tabela 3 – Tempos de retenção e bandas de absorção no UV dos picos no cromatograma do extrato de *P. boliviensis*

Substância	Padrões		PBN2017	
	tR (min)	UV (nm)	tR (min)	UV (nm)
Ácido gálico	3,59	267	4,81	266
Rutina	15,85	256 e 356	17,72	256 e 355
Poligaleno	18,13	291 e 319	19,99	291 e 319
Aurapteno	52,41	318	52,59	321
D1	-	-	3,04	267 e 310
D2	-	-	13,89	317
D3	-	-	31,79	255e 353
D4	-	-	37,91	265 e 347
D5	-	-	44,92	232; 273; 308; 333
D6	-	-	48,32	310
D7	-	-	53,38	276

(-) As amostras não foram identificadas quando comparadas aos padrões utilizados. D1-D7: substâncias desconhecidas. PBN2017: amostra de novembro de 2017.

3.3.3 Quantificação das substâncias identificadas

Dentre as substâncias identificadas, a rutina, poligaleno e o aurapteno foram quantificados (Tabela 4). O teor de rutina variou de acordo com o período de coleta em todos os anos, atingindo maiores valores no período seco, em 2016. Para o poligaleno também houve variação sazonal, sendo o maior teor encontrado no período seco de 2016. Já o aurapteno não apresentou alteração no teor nos diferentes períodos do ano de 2017, mas apresentou nos demais anos, e apresentou maior teor no período chuvoso de 2018.

Tabela 4 – Teor das substâncias quantificadas nos extratos de *P. boliviensis*

Amostra	Média do teor ± desvio padrão (µg de substância/g de extrato)					
	Agosto			Novembro		
Substância	2016	2017	2018	2016	2017	2018
Rutina	316,15± 4,63 ^a	425,44± 11,18 ^b	208,05± 6,09 ^c	508,11± 1,32 ^d	321,51± 4,64 ^a	239,55± 10,83 ^e
Poligaleno	88,52± 1,93 ^a	150,87± 4,91 ^b	76,61± 2,64 ^c	168,72± 3,03 ^d	73,39± 0,28 ^c	102,20± 2,06 ^e
Aurapteno	91,26± 1,59 ^a	54,19± 0,02 ^b	99,50± 2,86 ^c	28,79± 0,57 ^d	51,99± 0,97 ^b	34,72± 0,54 ^e

Análise realizada por substância: ANOVA, Teste Tukey ($p \leq 0,05$). Amostras identificadas com mesma letra na mesma linha não apresentam diferença estatística.

3.3.4 Validação do método de quantificação

Os tempos de retenção e bandas de absorção obtidos nos espectros no UV dos padrões e substâncias analisadas são semelhantes, mostrando a seletividade do método (Tabela 3). Para a linearidade, tem-se valores de r maiores que 0,99; a precisão foi expressa em valores menores que 5%; a exatidão entre 80-120%; os limites de detecção foram de 0,49, 0,10 e 0,88 µg/mL, e de quantificação de 1,63, 0,33 e 2,94 µg/mL, para rutina, poligaleno e aurapteno, respectivamente (Tabela 5); a robustez também se mostrou adequada, pois apesar das alterações não houve diferenças na resolução dos cromatogramas e na identificação e quantificação dos

metabólitos (Material suplementar), podendo-se observar que o método, desenvolvido para quantificação das três substâncias, satisfaz as exigências do ICH.

Tabela 5 – Parâmetros avaliados para validação do método de quantificação das substâncias nos extratos de *P. boliviensis* por CLAE-DAD

Substância	Intervalo (µg/mL)	Equação da reta	r (n=3)	Precisão DPR(%)	Exatidão (%) (n=3)	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
Rutina	50-2000	$y = 13,78x + 645,35$	0,997	0,81-2,98	80,74-93,43	0,49±0,00	1,63±0,01
Poligaleno	40-180	$y = 53,73x + 205,40$	0,999	0,75-2,63	86,59-118,86	0,10±0,00	0,33±0,01
Aurapteno	10-150	$y = 21,24x - 184,56$	0,995	0,41-2,32	92,43-106,36	0,88±0,02	2,94±0,07

3.3.5 Quantidade relativa dos picos majoritários

Avaliando a quantidade relativa das substâncias (Tabela 6), observa-se que tanto para as identificadas, como para as desconhecidas houve diferenças sazonais, com exceção da D1 e D7 no ano de 2016, e D2 e D5 em 2018.

Tabela 6 – Quantidade relativa das substâncias nos extratos de *P. boliviensis*

Amostra	Média ± DP (%)					
	Agosto			Novembro		
Substância	2016	2017	2018	2016	2017	2018
D1	15,18±0,79 ^a	13,87±0,65 ^b	9,28±0,25 ^c	15,55±0,58 ^a	10,54±0,49 ^d	11,43±0,22 ^d
D2	6,68±0,26 ^a	6,64±0,29 ^a	5,51±0,21 ^b	7,64±0,50 ^c	8,70±0,23 ^d	5,39±0,18 ^b
Rutina	20,24±0,84 ^a	16,70±0,44 ^b	17,04±0,41 ^b	18,60±0,30 ^c	21,39±0,58 ^d	18,19±0,64 ^c
Poligaleno	19,48±0,30 ^a	21,42±0,47 ^b	20,95±0,23 ^b	22,53±0,60 ^c	17,48±0,42 ^d	26,25±0,33 ^e
D3	10,85±0,34 ^a	11,31±0,22 ^a	11,00±0,44 ^a	13,64±0,30 ^b	10,04±0,65 ^c	12,73±0,63 ^d
D4	9,28±0,08 ^a	14,39±0,06 ^b	13,10±0,35 ^c	12,84±0,20 ^c	13,63±0,48 ^d	12,24±0,18 ^c
D5	4,73±0,20 ^a	5,45±0,27 ^b	5,58±0,07 ^b	3,97±0,26 ^c	4,59±0,60 ^a	5,44±0,02 ^b
D6	4,43±0,07 ^a	5,23±0,02 ^b	3,32±0,07 ^c	3,19±0,41 ^c	4,62±0,12 ^a	4,17±0,08 ^d
Aurapteno	6,89±0,09 ^a	2,49±0,02 ^b	9,35±0,10 ^c	1,04±0,03 ^d	3,88±0,18 ^e	2,55±0,04 ^b
D7	2,23±0,04 ^a	2,49±0,92 ^a	4,85±0,43 ^b	1,02±0,11 ^a	5,12±1,46 ^b	1,61±0,03 ^a

Análise realizada por substância: ANOVA, Teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Amostras identificadas com mesma letra na mesma linha não apresentam diferença estatística. D1-D7: substâncias desconhecidas.

3.3.6 Avaliação das atividades biológicas

Os resultados das atividades biológicas realizadas estão dispostos na Tabela 7. Na avaliação da atividade antioxidante, observou-se que no teste do sequestro do radical livre estável DPPH•, com exceção do ano de 2018, não houve variação sazonal, e a menor CE₅₀ foi obtida para o período chuvoso de 2016. Já no teste da inibição da auto oxidação do β-caroteno, houve variação sazonal apenas no ano de 2017, e a maior atividade antioxidante foi observada para a amostra do período chuvoso de 2017, bem como para os dois períodos do ano de 2018. O único teste que apresentou variação sazonal em todos os anos foi a letalidade frente à *Artemia*

salina. Para esse teste, o menor valor de CL_{50} foi encontrado para a amostra do período chuvoso de 2017.

Tabela 7 – Avaliação das atividades biológicas para extratos de *P. boliviensis*

Amostra	Média ± desvio padrão						Padrão
	Agosto			Novembro			
Teste	2016	2017	2018	2016	2017	2018	Propilgalato
DPPH	7,69 ± 0,15 ^a	11,66 ± 0,62 ^b	12,63 ± 0,24 ^c	9,38 ± 0,31 ^d	12,56 ± 0,10 ^c	12,87 ± 0,69 ^c	0,21 ± 0,01 *
β-car	50,36 ± 1,48 ^a	61,40 ± 3,90 ^b	82,79 ± 0,50 ^c	54,32 ± 4,57 ^a	79,76 ± 0,29 ^c	80,97 ± 0,13 ^c	98,78 ± 2,58 *
TAS	49,02 ± 1,07 ^a	22,33 ± 0,57 ^b	98,73 ± 5,55 ^c	77,44 ± 1,37 ^d	49,46 ± 1,50 ^a	139,31 ± 6,68 ^c	-

ANOVA. Amostras identificadas com mesma letra minúscula na mesma linha não apresentam diferença estatística pelo Teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). *Todas as amostras diferiram dos padrões pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). DPPH = teste do sequestro do radical livre DPPH• (CE_{50} em mg/mL), β-car = inibição da auto oxidação do β-caroteno em 20 min (%), TAS = teste de letalidade frente à *Artemia salina* (CL_{50} em µg/mL).

3.3.7 Influência dos elementos climáticos

Através da correlação de Pearson (Figura 3) foi possível observar que os elementos climáticos influenciaram na produção de algumas substâncias.

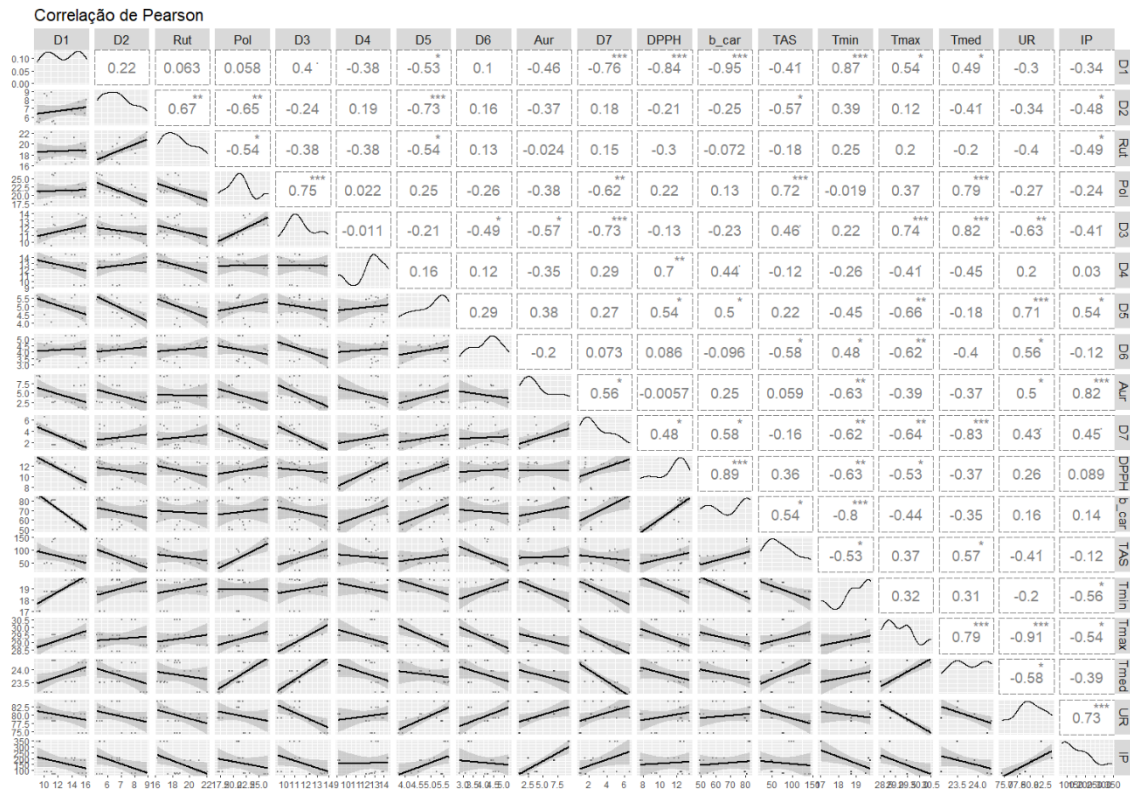


Figura 3 – Correlação de Pearson entre os principais componentes químicos, atividades biológicas e elementos climáticos dos diferentes períodos de coleta da *P. boliviensis*.

Aur: aurapteno. b_car: inibição da auto-oxidação do β-caroteno. D1-D7: substâncias desconhecidas. DPPH: sequestro do radical livre DPPH•. IP: índice pluviométrico. Pol: poligaleno. Rut: rutina. TAS: letalidade frente à *Artemia salina*. Tmax: temperatura máxima. Tmed: temperatura média. Tmin: temperatura mínima. UR: umidade relativa.

*** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$; . $p \leq 0,1$.

A temperatura apresentou associação linear positiva com diferentes substâncias, como D1 (87%, 54% e 49%), que correlacionou com as temperaturas mínima (Tmin), média (Tmed) e máxima (Tmax), respectivamente; o poligaleno, com Tmed (79%); D3 com Tmax (74%) e Tmed (82%). Contudo, observou-se também algumas correlações negativas, como D2 com Tmed (-41%); D4 (-41%) e D5 (-66%) com a Tmax; aurapteno com Tmin (-63%); e D7 (-62%, -64%, -83%) com Tmin, Tmax e Tmed, respectivamente. Para D6 foi observada correlação positiva com Tmin (48%) e negativa com Tmax (-62%).

Por outro lado, a umidade relativa (UR) apresentou correlação positiva com D5 (71%), D6 (56%), aurapteno (50%) e D7 (43%), entretanto uma correlação negativa com D3 (-63%). Já o índice pluviométrico (IP) apresentou correlação negativa com D2 (-48%), rutina (-49%) e D3 (-41%), e positiva com D5 (54%), aurapteno (82%) e D7 (45%).

Com relação às atividades biológicas, observou-se correlação negativa com a Tmin (-63%) e Tmax (-53%) para o teste de sequestro do radical livre DPPH•, e Tmin (-80%) e Tmax (-44%) para o teste de inibição da auto oxidação do β -caroteno. Para o TAS, o correlograma aponta correlação positiva com a Tmed (57%), e negativa com a Tmin (-53%) e UR (-41%).

Correlacionando as substâncias identificadas por CLAE-DAD com os métodos de atividades biológicas, para os testes de avaliação da atividade antioxidante, apenas D1 apresentou correlação negativa com o teste de sequestro do radical livre DPPH• (-84%) e teste de inibição da auto oxidação do β -caroteno (-95%), e D4, D5 e D7 apresentaram correlação positiva, com o teste de sequestro do radical livre DPPH•, de 70%, 54% e 45%, e de 44%, 50% e 58%, para o teste de inibição da auto oxidação do β -caroteno. Na avaliação da letalidade (TAS), D1 (-41%), D2 (-57%), D3 (-46%) e D6 (-58%) apresentaram correlação negativa, e o poligaleno, correlação positiva (72%).

3.3.8 Análise de cluster da composição química, atividades biológicas, elementos climáticos e período de coleta

A análise de agrupamento hierárquico (Figura 4) revelou a formação de quatro grupos com base na composição química, atividades biológicas e elementos climáticos (Grupo A - D). No 'Grupo A' é confirmada a correlação entre aurapteno, D5, IP e UR; no 'Grupo B', as correlações entre D4, D7, DPPH e β -caroteno; no 'Grupo C' entre D3, poligaleno, TAS, Tmed e Tmax; e no 'Grupo D', as correlações entre Tmin, D1, D2, D6 e rutina.

Com relação a variação sazonal, observa-se a formação de dois grupos. O 'Grupo 1' contemplou as amostras do período seco (PBN2016 e PBN2017) e, de forma geral, apresenta maiores temperaturas, menores valores de UR e IP, maior produção de poligaleno e D3, e menor

produção de aurapteno e D7, além de menor letalidade frente ao microcrustáceo *A. salina*, com os maiores valores de CL₅₀.

O ‘Grupo 2’ é formado pelas amostras do período chuvoso, com menores temperaturas, maiores valores de UR e IP, e maior produção de D4 e D6, menores teores de poligaleno e D3, além de menor atividade antioxidante pelo teste de sequestro do radical livre DPPH• e maior letalidade frente à *A. salina*. No entanto, PBN2017 teve maior similaridade com as amostras do período chuvoso, mostrando-se como um período atípico.

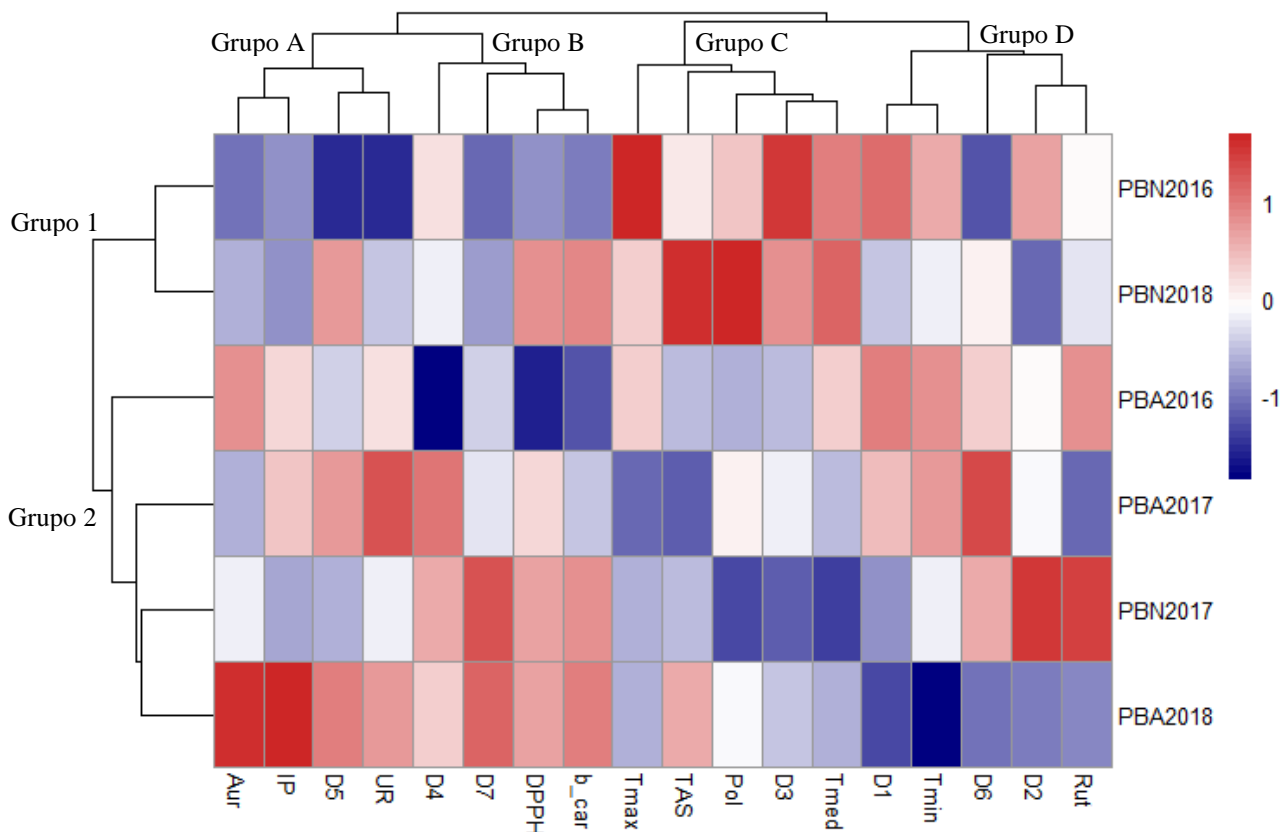


Figura 5 – Mapa de calor (heatmap) e agrupamento hierárquico dos diferentes períodos de coleta da *P. boliviensis* quanto aos principais componentes químicos, atividades biológicas e elementos climáticos.

Aur: aurapteno. b_car: inibição da auto-oxidação do β -caroteno. D1-D7: substâncias desconhecidas. DPPH: sequestro do radical livre DPPH•. IP: índice pluviométrico. PBA: amostras de agosto. PBN: amostras de novembro. Pol: poligaleno. Rut: rutina. TAS: letalidade frente à *Artemia salina*. Tmax: temperatura máxima. Tmed: temperatura média. Tmin: temperatura mínima. UR: umidade relativa.

3.4 Discussão

A sazonalidade não afetou o rendimento dos extratos, o que se mostra vantajoso, visto que independente do período, foi possível obter o mesmo rendimento no processo extrativo. Contudo, além do rendimento, a composição química também é um aspecto relevante, tendo em vista que a mudança nos metabólitos secundários presentes, pode influenciar na expressão da atividade biológica.

Nesse sentido, a análise por CLAE-DAD evidenciou que o perfil químico também foi mantido, mostrando que, independente do período de coleta, a *P. boliviensis*, apresentou, qualitativamente, os mesmos metabólitos secundários. De acordo com Wang et al. (2010), a utilização do *fingerprint* é útil na caracterização de extratos vegetais, visto a complexidade dos mesmos. Dessa forma, esse dado pode ser usado tanto para identificação, como no controle de qualidade de espécies vegetais que são utilizadas de forma medicinal, garantindo assim, que os metabólitos necessários para ação biológica estão presentes naquele extrato.

Quanto aos metabólitos identificados, a rutina e o ácido gálico ainda não tinham sido descritos na espécie *P. boliviensis*. O ácido gálico já foi descrito em outras espécies de Polygalaceae, como *Securidaca longipedunculata* (MONGALO et al., 2015) e *Asemeia ovata* (ROCHA et al., 2018), e em espécies de *Polygala*, como *P. senega* (LINDLEY; TORREY, 1831). Do mesmo modo, a rutina também foi descrita em *Securidaca longipedunculata* e *Asemeia ovata* (ROCHA et al., 2018; MONGALO et al., 2015), além da *Bredemeyera floribunda* (ALVES et al., 2019), mas também em espécies do gênero *Polygala*, como em *P. amarella* (DUBOIS et al. 1989), *P. paniculata* (LAPA et al., 2007) e *P. molluginifolia* (VENZKE et al., 2013; ARRUDA-SILVA et al., 2014), mostrando que esses compostos são comuns às espécies do gênero *Polygala* e da família Polygalaceae.

Já as cumarinas, aurapteno e o poligaleno, tinham sido isolados anteriormente em *P. boliviensis* (SILVA, 2015). O aurapteno também foi relatado nas espécies *P. paniculata* (HAMBURGER; GUPTA; HOSTETTMANN, 1985) e *P. altomontana* (TIZZIANI et al., 2018), enquanto o poligaleno foi descrito apenas em *P. boliviensis*.

Os demais picos apresentados não corresponderam aos padrões avaliados, mas sete picos majoritários estavam presentes em todas as amostras analisadas de *P. boliviensis* (D1-D7). Os espectros no UV das substâncias desconhecidas apresentaram de uma a quatro bandas, na faixa de 220 a 360 nm (Tabela 3). Para D1, nota-se banda característica para os ácidos fenólicos. Estudos com identificação de ácidos fenólicos por CLAE-DAD mostram que estes podem apresentar uma ou duas bandas, na região de 250 a 330 nm (TERMENTZI; KEFALAS; KOKKALOU, 2008).

As substâncias D3 e D4 apresentam um perfil característico de flavonoides, que costumam apresentar espectros com duas bandas, normalmente na faixa de 240-285 nm (banda II) e 300-400 nm (banda I), variando a depender da classe e do padrão de substituição. As flavonas costumam apresentar a banda I entre 304 e 350, já os flavonóis, entre 353 e 385 (ZUANAZZI, MONTANHA, ZUCOLOTTO, 2017). Assim, pode-se sugerir que D3 seja uma flavona e D4 um flavonol.

Para D5, D2, D6 e D7, observaram-se espectros com bandas em regiões características para xantonas, cumarinas e estilipironas, sendo essas classes bastante comuns no gênero *Polygala* (VENZKE, 2015). D5 apresentou quatro bandas na região característica para xantonas. Algumas xantonas relatadas em espécies de *Polygala* apresentam bandas de absorção nessa faixa, como a 1,3-diidróxii-7-metilxantona, com valores aproximados de 234, 255, 306 e 366 nm, a 1,7-diidróxii-2,3-metilenodioxixantona em 245, 295, 326, 377 nm, e a 1,7-diidróxii-2,3-dimetoxixantona em 226, 256, 297, 373 nm (PEREIRA, 2017).

D2 e D6 apresentaram bandas de absorção próximas às encontradas para o aurapteno e poligaleno, o que é um indicativo que essa substância seja uma cumarina. As cumarinas podem apresentar uma ou duas bandas, podendo ser uma banda na região entre 275-290 nm e outra na região entre 315-350 nm (PAIXÃO, 2016).

Já D7 apresentou banda de absorção em 276,29 nm relacionado a outras classes de aromáticos. As estilipironas comumente apresentam uma banda de absorção máxima em 250 nm (OLIVEIRA et al, 2007), porém a depender do padrão de substituição, podem haver deslocamentos para maiores comprimentos de onda, chegando até a bandas em torno de 300 a 400 nm (ANOUAR, WEBER, 2013).

Além dos espectros no UV, é possível levar em consideração também o tempo de retenção. Já que se trata de uma análise com uma coluna de fase reversa, as substâncias mais polares, apresentam menores tempos de retenção, a exemplo dos ácidos fenólicos; substâncias com esqueleto carbônico maior, porém contendo porções polares, como os flavonoides e cumarinas apresentam tempos de retenção intermediários; e xantonas, cumarinas com grandes cadeias laterais e estilipironas, apresentando os maiores tempos de retenção (ZONARO, 2016).

A avaliação quantitativa desses metabólitos secundários permitiu observar que a maior parte deles variou com o período de coleta, tanto em quantidade absoluta, o que foi possível avaliar para o poligaleno, rutina e aurapteno; como relativa, que foi realizada para as substâncias identificadas, mas também para as desconhecidas, mostrando que, mesmo mantendo os rendimentos dos extratos, a proporção dos metabólitos secundários variou. Essa variação é outro fator imprescindível para garantir determinadas atividades biológicas, pois apenas a presença do metabólito não implica que haja atividade, sendo necessária quantidade específica para que a atividade seja expressa.

Com relação à atividade antioxidante, observou-se que apesar dos dois testes utilizados avaliarem a mesma atividade, as amostras com maior atividade antioxidante pelo teste de sequestro do radical livre DPPH•, ou seja, com menores CE₅₀, diferiram das amostras mais ativas pelo teste da inibição da auto oxidação do β-caroteno, aquelas que apresentaram maior

porcentagem de inibição da oxidação no sistema β -caroteno/ácido linoleico. Essas diferenças provavelmente estão relacionadas às substâncias responsáveis pela atividade em cada teste, já que esses apresentam diferentes mecanismos antioxidantes e, por isso, nem sempre a mesma substância expressará atividade pelos dois métodos.

O teste de sequestro do radical livre DPPH• se baseia na estabilização de radicais livres do meio, que normalmente acontece pela capacidade das substâncias de doar o hidrogênio radicalar e deslocar o radical formado pela estrutura química (ALVES et al., 2010), e o teste da inibição da auto oxidação do β -caroteno determina a habilidade de proteger um substrato lipídico da oxidação, através da neutralização de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; KUÇUK et al., 2007; GIADA, 2014).

Assim, a maior atividade para o teste de sequestro do radical livre DPPH• se dará em extratos que apresentam maior teor de metabólitos capazes de doar hidrogênio radicalar e estabilizar o novo radical formado, como ácidos fenólicos e flavonoides, que apresentam hidroxilas em sua estrutura química. Analisando a correlação de Pearson, apenas D1 (-84%) apresentou correlação negativa com esse teste, o que significa que amostras com maiores teores de D1, apresentam menores CE_{50} e, conseqüentemente, maior atividade antioxidante através desse teste. Pelo espectro no UV e tempo de retenção é possível que D1 corresponda a um ácido fenólico, apresentando possíveis grupos doadores de H, o que pode justificar maior atividade (JACOBSEN, 2018).

Para o teste da inibição da auto oxidação do β -caroteno, substâncias menos polares são capazes de agir como antioxidantes através da neutralização de radicais livres por seus sistemas de ligações duplas conjugadas. A correlação de Pearson mostrou que para esse ensaio, D4 (44%), D5 (50%) e D7 (58%) apresentaram correlação positiva, mostrando que quanto maior o teor desses metabólitos no extrato, maior a ação antioxidante, por esse método. De acordo com espectros no UV, essas substâncias podem se referir a xantonas, cumarinas e estirilpironas. Os tempos de retenção na análise por CLAE-DAD, mostram ainda, que esses componentes apresentam média e baixa polaridade, o que pode justificar a ausência, ou poucos grupos doadores de hidrogênio, como hidroxilas. Dessa forma, essas substâncias não mostraram correlação negativa com o método de sequestro do radical livre DPPH•, porém a presença dos sistemas bi-alílicos em suas estruturas, permitiu que esses compostos fossem oxidados, protegendo o β -caroteno da auto oxidação, agindo assim como antioxidantes secundários, através da remoção de oxigênio (FERNANDES, 2019).

No teste de letalidade frente à *Artemia salina* foi observado que houve mudança na CL_{50} , também relacionada à variação dos teores dos metabólitos secundários. Na correlação de

Pearson, observou-se que D1 (-41%), D2 (-57%), D3 (-46%) e D6 (-58%) apresentaram correlação inversa com essa atividade, evidenciando que quanto maior o teor desses metabólitos secundários no extrato, menor a CL₅₀ e maior a letalidade.

De acordo com os espectros no UV, essas substâncias correspondem a ácido fenólico (D1), cumarinas (D2 e D6) e flavonoide (D3). Essas classes de substâncias podem atuar na proteção da planta contra o ataque de patógenos (BARRAL et al., 2017; PEREIRA, 2017), dessa forma, o maior o teor desses metabólitos implicou em maior letalidade frente ao microcrustáceo *A. salina*, mostrando que esse teste de toxicidade pode ser utilizado também para correlação com outras atividades biológicas que estão diretamente ligadas à letalidade de diferentes organismos.

Todos os compostos identificados fazem parte de grupos da classe dos fenólicos. Os fenólicos têm diferentes funções nos vegetais, como defesa contra fatores bióticos e abióticos, por isso, um dos fatores que regula sua produção são fatores ambientais, como a quantidade de água, luz, temperatura e composição do solo. As plantas dependem desses fatores para seu crescimento e desenvolvimento, assim a variação na quantidade desses componentes causa estresse nas plantas, variando a produção e acúmulo dos metabólitos secundários (VERMA, SHUKLA, 2015).

Através da análise de agrupamento hierárquico, é possível perceber que cada período caracteriza a produção aumentada de determinadas substâncias. De acordo com a literatura, não há um aumento simultâneo de todas as vias metabólicas, o que pode ser explicado pela expressão de genes que controlam certas vias, resultando no aumento de apenas alguns metabólitos (PRINSLOO, NOGEMANE, 2018).

A água é um fator que varia bastante nas diferentes estações do ano, e o estresse hídrico apresenta correlação positiva na produção de fenólicos, como os ácidos fenólicos e flavonoides (AKULA, RAVISHANKAR, 2011; YANG et al., 2018). Além disso, nos ambientes semiáridos, a maior intensidade da luz e temperatura mais alta estão relacionados aos períodos mais secos (PRINSLOO, NOGEMANE, 2018), e o aumento da luminosidade também está relacionado ao aumento desses metabólitos, devido as suas propriedades de proteção UV e propriedades antioxidantes, que reduzem o estresse oxidativo causado pela radiação (PAVARINI et al., 2012).

Nesse sentido, justifica-se as correlações positivas existentes entre temperatura com D1 (87% - T_{min}, 54% - T_{med} e 49% - T_{max}) e D3 (74% - T_{max} e 82% - T_{med}), correlação inversa entre D3 e UR (-63%), como também correlação inversa entre rutina (-49%) e D3 (-41%) com IP. Essas correlações indicam que altas temperaturas, baixa umidade relativa e baixo índice

pluviométrico favorecem a produção do ácido fenólico D1 e dos flavonoides D3 e rutina. Além disso, na análise hierárquica, observa-se maiores teores de D3 no período seco, que é caracterizado por maiores temperaturas e menores valores de UR e IP.

No entanto, alguns estudos apontam que para grupos específicos de flavonoides pode ocorrer aumento da produção com a diminuição da temperatura, mostrando que existe um mecanismo complexo e organizado na produção desses metabólitos, com vias metabólicas e enzimas específicas (PRINSLOO, NOGEMANE, 2018). Para o flavonoide D4, a correlação de Pearson mostrou correlação negativa com a temperatura (-41% - Tmax), evidenciando que menores temperaturas favorecem o aumento da produção desse metabólito. E o HCA comprovou os maiores teores de D4 foram encontrados no período chuvoso, que apresentou temperaturas mais baixas.

O aumento da intensidade da luz influencia também o aumento da produção de algumas cumarinas, como psoraleno, bergapteno, xantotoxina e umbeliferonas (AKULA, RAVISHANKAR, 2011; PRINSLOO, NOGEMANE, 2018). Dentre as cumarinas identificadas no presente trabalho, apenas o poligaleno apresentou correlação positiva na análise de Pearson com a temperatura (79% - Tmed). Do mesmo modo, também foi a única cumarina que apresentou maiores teores no período da estação seca, o que provavelmente está relacionado ao aumento da luminosidade e da temperatura, como evidenciado pela HCA.

No caso da cumarina D2, a correlação de Pearson apontou correlação negativa com a temperatura (-41% - Tmed), sugerindo que menores temperaturas implicam em maiores teores dessa substância, porém também demonstrou correlação negativa com o índice pluviométrico (-48%), o que significa que maiores teores estariam relacionados a períodos menos chuvosos. Analisando a HCA, observa-se que D2 está agrupada no período chuvoso, porém pelo mapa de calor é possível perceber variação no teor desse metabólito.

Os fenólicos também protegem as plantas de infecções fúngicas (VERMA, SHUKLA, 2015), o que pode justificar o aumento de alguns compostos nos períodos mais chuvosos, com maior umidade relativa e temperaturas mais amenas, nos quais a umidade deixa o ambiente mais propício para a proliferação desses microrganismos (COLHOUN, 1973).

A HCA mostrou que no período chuvoso foram encontrados os maiores teores da cumarina D6. Além disso, na correlação de Pearson, D6 apresentou correlação inversa com Tmax (-62%) e positiva com UR (56%). A correlação de Pearson demonstrou ainda correlação positiva entre D5 (xantona), aurapteno e D7 (estirilpirona) com UR (71%, 50% 43%), e IP (54%, 82%, 45%), além da correlação inversa com a temperatura (-66% - Tmax; -63% - Tmin; -62% - Tmin, -64% - Tmax, -83% - Tmed, respectivamente), evidenciando que temperaturas

mais baixas, maiores valores de umidade relativa e índice pluviométrico influenciam positivamente no teor desses metabólitos.

Cumarinas como febalosina e aurapteno também apresentam atividade antifúngica (PEREIRA, 2017), e a escopoletina tem seu acúmulo relacionado a resistência contra fungos (MENDES, 2008). O mesmo é relatado para algumas xantonas, como atividade fungicida contra fitopatógenos (SCIO, 2004), evidenciando assim que o aumento dessas substâncias pode estar relacionado a proteção da planta frente a esses patógenos.

3.5 Conclusão

Esse é o primeiro relato de ácido gálico e rutina na espécie *P. boliviensis*, o que contribui para a quimiosistemática do gênero *Polygala* e família Polygalaceae. Além disso, o desenvolvimento e validação de método para identificação e quantificação de rutina, poligaleno e aurapteno por CLAE-DAD, permite que esse seja utilizado para avaliação de extratos do gênero e da família.

O estudo da variação sazonal química e biológica de *P. boliviensis* é pioneiro, não havendo relatos desse tipo de estudo com espécies de *Polygala*, principalmente no semiárido baiano, que apresenta sazonalidade singular. É possível verificar que apesar de não haver variação qualitativa no perfil químico dos extratos, há influência na quantidade dos metabólitos secundários produzidos. Contudo para as atividades biológicas, a variação foi observada para a atividade antioxidante pelo teste de sequestro do radical livre DPPH• e letalidade frente à *A. salina*.

Os elementos climáticos também influenciam, de forma individual ou associada, a produção dos metabólitos e expressão das atividades. Além disso, a quantidade de algumas substâncias está correlacionada com a expressão das atividades biológicas avaliadas.

Assim, o conhecimento dos fatores que influenciam essas variações serve como base para estudos posteriores que visem a utilização desses extratos e/ou substâncias isoladas para desenvolvimento de produtos fitoterapêuticos, pois pode facilitar a determinação do período de coleta ideal ou as condições ideais de cultivo para a espécie de acordo com a finalidade pretendida.

REFERÊNCIAS

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p. 114-140, 2007.

AKULA, R.; RAVISHANKAR, G.A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, p. 1720-1731, 2011.

ALVES, C.Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010.

ALVES, N.T.Q. et al. Anti-ophidian activity of *Bredemeyera floribunda* Willd. (Polygalaceae) root extract on the local effects induced by *Bothrops jararacussu* venom. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 52, p.1-8, 2019.

ANOUAR, E.H.; WEBER, J.-F.F. Time-dependent density functional theory study of UV/vis spectra of natural styrylpyrones. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 115, p. 675–682, 2013.

ARRUDA-SILVA, F. et al. *Polygala molluginifolia* A. St.-Hil. and Moq. prevent inflammation in the mouse pleurisy model by inhibiting NF- κ B activation. **International Immunopharmacology**, v. 19, p. 334–341, 2014.

BARRAL, B. et al. Evaluating the response to *Fusarium ananatum* inoculation and antifungal activity of phenolic acids in pineapple. **Fungal Biology**, v. 121, p.1045-1053, 2017.

CHAVES, T.P. et al. Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 847-853, 2013.

COLHOUN, J. Effects of environmental factors on plant disease. **Annuals Reviews of Pathology**, v. 11, p. 343-364, 1973.

DINIZ, A.F.; SANTOS, R.L.; SANTO, S.M. Avaliação dos riscos de seca para o município de Feira de Santana-BA associado à influência do El Niño no semi-árido do nordeste brasileiro. **Geografia's**, v. 1, p. 18 – 24, 2008.

DUARTE-ALMEIDA, J.M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 446-452, 2006.

DUBOIS, M.A. et al. Amarellósido, a bitter tri-O-acetyl tri-O-benzoyl tetrasaccharide from *Polygala amarella*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 3355-3359, 1989.

FERNANDES, L.A. **Antioxidantes naturais para aplicação em alimentos**. 2019. 54f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

FREIRE, N.C.F. et al. Mapeamento e análise espectro-temporal das unidades de conservação de proteção integral da administração federal no bioma caatinga. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, p.24773-24781, 2020.

GIADA, M.L.R. Uma abordagem sobre a capacidade antioxidante *in vitro* de alimentos vegetais e bebidas. **Demetra**, v. 9, p. 137-146, 2014.

HAMBURGER, M.; GUPTA, M.; HOSTETTMANN, K. Coumarins from *Polygala paniculata*. **Planta Medica**, v. 51, p. 215-217, 1985.

HIDALGO, M. E.; FERNANDÉZ, E.; QUILHOT, W.; LISSI, E. Antioxidant activity of depsides and depsidones. **Phytochemistry**, v. 37, p. 1585-1587, 1994.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH); **Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B** (CPMP/ICH/281/95), 1995b. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM128049.pdf>>. Acesso em: 19 jul. 2018.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH); **Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology, Q2A** (CPMP/ICH/381/95), 1995a. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM128048.pdf>>. Acesso em: 19 jul. 2018.

ISAH, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biological Research**, v. 52, p. 1-25, 2019.

JACOBSEN, C. Oxidative Rancidity. In: MELTON, L.; SHAHIDI, F.; VARELIS, P. (Org.) **Encyclopedia of Food Chemistry**. v.2. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 261-269.

KUÇUK, M. et al. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from *Anatolia*. **Food Chemistry**, v.100, p. 526–534, 2007.

LACAILLE-DUBOIS; M-A.; DELAUDE, C.; MITAINE-OFFER, A-C. A review on the phytopharmacological studies of the genus *Polygala*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 249, 112417, 2020.

LAPA, F.R. et al. Gastroprotective activity of the hydroalcoholic extract obtained from *Polygala paniculata* L. in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 1413–1419, 2007.

LINDLEY, J.; TORREY, J. **An introduction to the natural system of botany**: or, A systematic view of the organization, natural affinities, and geographical distribution of the whole vegetable kingdom; together with the uses of the most importante species in medicine, the arts, and rural or domestic economy. New York: G. & C. & H. Carvill, 1831, 393p.

MALAFAIA, C.B. Effects of Caatinga plant extracts in planktonic growth and biofilm formation in *Ralstonia solanacearum*. **Microbial Ecology**, v. 75, p. 555–561, 2018.

MALTERUD, K.E. et al. Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones. **Pharmacology**, v. 47, p. 77-85. 1993.

MARENCO, J.A. et al. Variabilidade e mudanças climáticas no semiárido brasileiro. In: GHEYI, H.R. et al. **Recursos hídricos em regiões áridas e semiáridas**, Campina Grande, PB: Instituto Nacional do Semiárido, Cruz das Almas, BA: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012. p. 384-422.

MENDES, B.G. *Polygala sabulosa* A. W. Bennett: obtenção de estilipironas e cumarinas, preparo de análogos e ensaios de atividades biológicas. 2008, 192f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MEYER, B.N. et al. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31 -34. 1982.

MONGALO, N.I. et al. *Securidaca longipedunculata* Fresen (Polygalaceae): A review of its ethnomedicinal uses, phytochemistry, pharmacological properties and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v.165, p.215–226, 2015.

- OLIVEIRA, A.M. et al. Evaluation of micronuclei frequency in *Tradescantia pallida* pollen mother cells treated with ethanolic extracts isolated from *Cryptocarya mandioccana*, *Cryptocarya moschata* and *Pterogyne nitens*. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 20, p. 73-78, 2007.
- PAIXÃO, T.P. **Estudo fitoquímico e avaliação do efeito antinociceptivo de uma fração rica em cumarinas de *Ayapana triplinervis* (Asteraceae)**. 2016. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Belém.
- PASTORE, J.F. et al. **Polygalaceae in lista de espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB20543>>. Acesso em: 08 nov. 2018.
- PAVARINI, D.P. et al. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v.176, p. 5-16, 2012.
- PEREIRA, M. **Estudo fitoquímico e biológico de *Polygala linoides***. 2017. 204 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- PRINSLOO, G.; NOGEMANE, N. The effects of season and water availability on chemical composition, secondary metabolites and biological activity in plants. **Phytochemistry Reviews**, v.17, p. 889–902, 2018.
- ROCHA, J.L.C. et al. *Asemeia ovata* (Polygalaceae): Quantitative determination and evaluation in silico of identified substances by HPLC-DAD. **Computational Biology and Chemistry**, v.75, p. 65–73, 2018.
- ROCHA, J.L.C. et al. Evaluation of Biological Activity of *Polygala boliviensis* in Experimental Models. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 18, p. 793-802, 2019
- ROCHA, J.L.C. et al. Quantificação de salicilato de metila em quatro gêneros de Polygalaceae por CLAE-DAD. **Química Nova**, v.35, p. 2263-2266, 2012.
- SCIO, E. Cumarinas encontradas no gênero *Kielmeyera* - Família Clusiaceae. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 85, p. 27-31, 2004.
- SERRANO, C.; ORTEGA, T.; VILLAR, A. Biological activity of traditional medicines from Spain and Guatemala. *Artemia salina* bioassay: a revision. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 118 – 120. 1996.
- SILVA, D.F. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Polygala boliviensis* A.W. Benn (Polygalaceae)**. 2015. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- SILVA, D.F. et al. Poligalen, a new coumarin from *Polygala boliviensis*, reduces the release of TNF and IL-6 independent of NF-kB downregulation. **Fitoterapia**, v. 113, p. 139-143, 2016.
- TERMENTZI, A.; KEFALAS, P.; KOKKALOU, E. LC–DAD–MS (ESI+) analysis of the phenolic content of *Sorbus domestica* fruits in relation to their maturity stage. **Food Chemistry**, v.106, p. 1234–1245, 2008.

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

TRETIN, D.S. et al. Medicinal plants from Brazilian Caatinga: antibiofilm and antibacterial activities against *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Caatinga**, v.27, p.264-271, 2014.

TRETIN, D.S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p.327-335, 2011.

VENZKE, D. **Estudo quimiosistemático de espécies do gênero *Polygala* e avaliação das propriedades biológicas**. 2015. 229 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

VENZKE, D. et al. PAMPA Permeability, Acetylcholinesterase Inhibition and Antioxidant Activity of Pyranoisoflavones from *Polygala molluginifolia* (Polygalaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 1991-1997, 2013.

VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v.2, p. 105–113, 2015.

WANG, H.-L. et al. Chemical Fingerprinting by HPLC-DAD-ELSD and Principal Component Analysis of *Polygala japonica* from Different Locations in China. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 8, p. 343-348, 2010.

YANG, L. et al. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. **Molecules**, v. 23, p. 2-26, 2018.

ZONARO, V.A. **Análise de Estirilpironas de *Cryptocarya* por HPLC-DAD-MS**. 2016. 100f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A.; ZUCOLOTTO, S.M. Flavonoides. In: SIMÕES, C.M.O. et. al. (Org.) **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. e-PUB., p. 389-440.

CAPÍTULO 4

**Anatomia e histoquímica dos órgãos vegetativos de *Polygala boliviensis* A. W. Benn
(Polygalaceae)**

CAPÍTULO 4: Anatomia e histoquímica dos órgãos vegetativos de *Polygala boliviensis* A. W. Benn. (Polygalaceae)

Resumo

A maior parte das pesquisas com o gênero *Polygala* referem-se a estudos taxonômicos, fitoquímicos e avaliação biológica, não havendo muitos trabalhos anatômicos e histoquímicos, principalmente a respeito do eixo vegetativo. Para vegetais com potencial medicinal, a anatomia e histoquímica podem auxiliar no processo de identificação, garantindo a autenticidade da espécie. Nesse sentido, o trabalho teve como objetivo descrever a anatomia foliar e caulinar de *Polygala boliviensis* e identificar as principais classes de substâncias produzidas por esses órgãos vegetativos através de testes histoquímicos. A espécie foi coletada no *campus* da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, e fixadas em FAA50 e FNT, seguindo de desidratação e acondicionamento em álcool 70%. Para caracterização estrutural em microscopia de luz, as amostras foram incluídas em historesina e coradas com azul de toluidina. Já a caracterização histoquímica foi realizada com amostras seccionadas em criomicrotomo e submetidas a diferentes testes. A lâmina foliar é anfiestomática e estômatos também foram detectados no eixo caulinar. Cutícula e tricomas não glandulares foram encontrados nas folhas e caules, podendo ser estratégias de adaptação ao clima semiárido. As folhas apresentam cavidades secretoras, que através da histoquímica revelaram secreção de lipídios. O trabalho traz resultados inéditos para a espécie *P. boliviensis* e contribui com a caracterização da mesma, colaborando na diferenciação de espécies morfologicamente semelhantes e contribuindo com a taxonomia do gênero *Polygala* e da família Polygalaceae.

Palavras-chave: Cavidades secretoras. Lipídios. Tricomas tectores.

Abstract

Most of the research with the genus *Polygala* refers to taxonomic, phytochemical and biological evaluation studies, with little anatomical and histochemical work, mainly regarding the vegetative axis. For vegetables with medicinal potential, anatomy and histochemistry can assist in the identification process, ensuring the authenticity of the species. In this sense, the present work aimed to describe the leaf and stem anatomy of *Polygala boliviensis* and to identify the main classes of substances produced by this vegetative organs through histochemical tests. The species was collected on the *campus* of the State University of Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, and fixed in FAA50 and NBF, followed by dehydration and conditioning in 70% alcohol. For structural characterization under light microscopy, the samples were included in historesin and stained with toluidine blue. On the other hand, histochemical characterization was carried out with samples sectioned in cryomicrotome and subjected to different tests. The leaf blade is amphistomatic and stomata have also been detected in the stem axis. Cuticle and non-glandular trichomes were found in the leaves and stems, which may be strategies for adaptation to the semi-arid climate. The leaves have secretory cavities, which through histochemistry have revealed lipid secretion. The work brings unprecedented results for the species *P. boliviensis* and contributes to its characterization, contributing to the differentiation of morphologically similar species and contributing to the taxonomy of the *Polygala* genus and the Polygalaceae family.

Keywords: Lipids. Secretory cavities. Trichomes.

4.1 Introdução

A família Polygalaceae apresenta cerca de 1000 espécies, 20 gêneros e três tribos, sendo o gênero *Polygala* o mais representativo, abrangendo cerca de 50% das espécies (LACAILLE-DUBOIS; DELAUDE; MITAINE-OFTER, 2020). Estudos anatômicos citam a presença de células oleíferas e cavidades secretoras lisígenas (CHODAT, 1891); ocorrência de cristais de oxalato, tricomas unicelulares, (SOLEREDER, 1908; METCALFE; CHALK, 1957); e presença de saponina nas células parenquimáticas de *P. tenuifolia* (TENG et al., 2009).

No Brasil, alguns trabalhos relatam descrições anatômicas e histoquímicas dos órgãos vegetativos de espécies de *Polygala*, indicando a presença de idioblastos secretores com conteúdo fenólico, ducto lisígeno mucilaginoso, além de cavidades secretoras (AGUIAR-DIAS, 2008); nectários extranupciais (AGUIAR-DIAS, YANOMOTO, CASTRO, 2011); secreção na epiderme, idioblastos traqueodais ou com drusas, cavidades lisígenas, além de tricomas tectores unicelulares e de ápice dilatado (AGUIAR-DIAS, YANOMOTO, CASTRO, 2012).

O estudo anatômico e histoquímico de espécies com potencial medicinal se mostra como ferramenta importante, visto que a presença de algumas estruturas auxilia no processo de identificação da espécie vegetal (FONSECA; MEIRA; CASALI, 2008). Além disso, a produção, acúmulo e secreção de metabólitos permitem avaliar a autenticidade do material vegetal e possibilita a diferenciação de espécies botanicamente próximas (WALKER et al., 2008).

A espécie *Polygala boliviensis* A.W.Benn. (Polygalaceae) é uma espécie nativa do Brasil, encontrada nos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Bahia e Paraíba. Até o momento estudos anatômicos e histoquímicos não foram realizados.

A maioria das pesquisas concentram-se na descrição morfológica (COELHO; AGRA; BARACHO, 2008; LIMA et al., 2018). Alguns estudos com abordagem química e farmacológica também foram realizados, a exemplo da quantificação de salicilato de metila (ROCHA et al., 2012), isolamento e identificação de cumarina inédita, poligaleno, com atividade imunomoduladora (SILVA et al., 2016), e avaliação do efeito antiedematogênico e antinociceptivo *in vivo* (ROCHA et al., 2019).

Considerando que outras espécies do gênero já revelaram estruturas secretoras em seus órgãos vegetativos, os metabólitos secundários e atividades farmacológicas já descritas para *P. boliviensis*, e a importância de estudos anatômicos e histoquímicos de espécies com potencial

medicinal, o trabalho teve como objetivo descrever a anatomia foliar e caulinar de *P. boliviensis* e identificar as principais classes de metabólitos secundários produzidas por esses órgãos vegetativos.

4.2 Material e métodos

Seis indivíduos de *P. boliviensis* foram coletados no campus da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, Bahia (12°16'00"S e 38°58'00"W) e a identificação do material foi realizada em comparação com a exsicata (HUEFS168956) depositada no herbário da UEFS.

Folhas e caules foram coletados e fixados em FAA50 (formalina, ácido acético, álcool etílico 50%, 1:1:18 v/v) por 24h (JOHANSEN, 1940) e FNT (formalina neutra tamponada; tampão fosfato, formalina, 9:1 v/v) por 48h (LILLIE, 1965), e mantidos sob vácuo. Após fixação, as amostras foram isoladas e desidratadas em série etílica até álcool etílico a 70%: 12h em álcool 50%, seguido de álcool 70%, para amostras em FAA; e água destilada por 8h, com trocas a cada 2h, seguido de álcool 30% e 50%, com trocas a cada 12h, e estocados em álcool 70%, para amostras em FNT (JOHANSEN, 1940).

A caracterização estrutural foi realizada por microscopia de luz, para isso as amostras foram incluídas em historesina segundo Meira e Martins (2003). Os blocos de historesina foram montados em suportes de madeira e submetidos a cortes seriados efetuados em micrótomo rotativo (modelo Leica RM2245), com espessura variável (10-15 µm). Os cortes foram colocados em lâminas histológicas, previamente limpas e secas, sobre gotas de água destilada em placa aquecida a 40 C° e depois corados com azul de toluidina (VIDAL, 1977.). As lâminas permanentes foram montadas com Verniz vitral incolor 500® (PAIVA et al., 2006).

A caracterização histoquímica foi realizada com amostras seccionadas em criomicrotomo (modelo Leica CM1850). As classes de metabólitos presentes no material foram investigadas usando os testes histoquímicos referidos na Tabela 1. O controle dos testes para substâncias lipofílicas foi realizado com solução extrativa composta por metanol/clorofórmio/água/HCl (66:33:4:1 v/v) (HIGH, 1948). Os controles dos testes para substâncias hidrofílicas foram realizados conforme protocolo padrão.

Após observação e análise do laminário, a documentação foi realizada em fotomicroscópio (modelo Olympus BX51) equipado com sistema Olympus A330.

Tabela 1 - Relação dos testes histoquímicos realizados para identificação dos principais metabólitos secretados em *P. boliviensis*

Metabólito	Reagente	
Lipídios	Lipídios totais	Preto de Sudan B (PEARSE, 1985)
	Lipídios ácidos e neutros	Sudan escarlate (PEARSE, 1985)
Terpenoides	Essências e óleo-resinas	Reagente de Nadi (DAVID; CARDE, 1964)
	Lactonas sesquiterpênicas	Ácido sulfúrico (GEISSMAN; GRIFFIN, 1971)
	Compostos fenólicos totais	Dicromato de potássio (GABE, 1968)
Compostos fenólicos		Cloreto férrico (JOHANSEN, 1940)
	Tanino	Vanilina (MACE; HOWELL, 1974)
	Lignina	Floroglucinol (JOHANSEN, 1940)
Borracha		Vermelho de óleo (PEARSE, 1985)
Alcaloides		Draggendorf (FURR; MAHLBERG, 1981)
		Dittmar (FURR; MAHLBERG, 1981)
		Wagner (FURR; MAHLBERG, 1981)
		Ellram (FURR; MAHLBERG, 1981)
Proteínas	Proteínas totais	Azul brilhante de coomassie (FISHER, 1968)
		XP (O'BRIEN; MCCULLY, 1981)
		Anilina azul escura (FISHER, 1968)
Polissacarídeos	Polissacarídeos totais	Ácido periódico – Reagente de Schiff (MCMANUS, 1948)
	Amido	Lugol (JOHANSEN, 1940)
	Mucopolissacarídeos	Azul alciano (PEARSE, 1985)
	Mucilagem	Pizzolato; Lillie (PIZZOLATO, 1977)

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Anatomia da folha e pecíolo

A lâmina foliar apresenta epiderme unisseriada (Figura 1.A-C). Aparentemente, a parede periclinal externa e a cutícula apresentam espessura delgada (Figura 1B). Metcalfe e Chalk (1957) descreveram a presença de cutícula granular, raramente estriada nas espécies da família Polygalaceae. Marques e Peixoto (2007) relataram que as espécies do gênero *Polygala* apresentam epiderme uniestratificada e Bejenaru et al. (2017) citaram epiderme unisseriada e presença de cutícula para *P. vulgaris*, assim como observado para a *P. boliviensis*.

A cutícula é constituída de cera e óleo, bloqueando alguns tipos de radiação ultravioleta e reduzindo a perda de água (CRANG, LYONS-SOBASKI, WISE, 2018), apresentando-se como estratégia para as espécies encontradas em regiões áridas (PALLARDY, 1981).

As folhas são anfiestomáticas e os estômatos apresentam-se no mesmo nível das demais células epidérmicas (Figura 1A, Figura 1C). Solereder (1908) afirmou que a maioria das espécies de Polygalaceae apresentam-se como anfiestomáticas, enquanto Marques (1979) referiu-se a presença de estômatos nas duas faces das espécies de Polygalaceae, ou apenas na inferior. Teng et al. (2009) demonstraram a presença de estômatos em ambas as faces de *P. tenuifolia*.

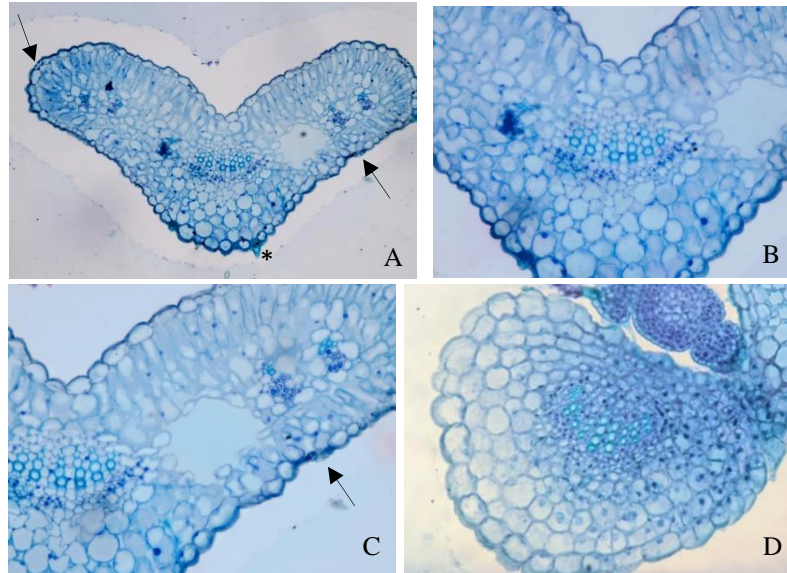


Figura 1 – Anatomia da folha e pecíolo de *Polygala boliviensis*
 A. Vista geral da lâmina foliar; estômatos (seta), tricoma de ápice agudo (*). Corte transversal. Aumento 20X. B. Folha; cutícula, epiderme unisseriada, parênquima paliádico e lacunoso, nervura central. Corte transversal. Aumento 40X. C. Folha; cavidade secretora, feixes vasculares periféricos, estômatos (seta). Corte transversal. Aumento 40X. D. Pecíolo; feixe vascular único. Corte transversal. Aumento 40X.

Os estômatos também têm papel fundamental na regulação da transpiração e trocas gasosas (CRANG, LYONS-SOBASKI, WISE, 2018). Mott, Gibson e O’Leary (1982) acreditam que as folhas anfistomáticas são mais vantajosas que as hipoestomáticas devido a maior eficiência das trocas gasosas, proporcionando maior condução de gás carbônico e capacidade fotossintetizante, o que teria valor adaptativo a ambientes com maior intensidade luminosa.

Nesse sentido, as características encontradas em *P. boliviensis* podem estar relacionadas a uma adaptação ao local. Por se tratar de uma espécie nativa do semiárido baiano, fazendo parte do bioma Caatinga (PASTORE et al., 2015), é submetida a alta incidência luminosa e estresse hídrico (MARENCO et al., 2012), o que pode ter levado a adaptações para menor perda de água e proteção contra luminosidade.

No estudo realizado por Marques e Peixoto (2007) com espécies do gênero *Polygala*, subgênero *Ligustrina*, as autoras observaram que, com exceção da *P. ulei*, que exibia estômatos em ambas as faces, para as demais espécies era apenas na face abaxial. Já Aguiar-Dias, Yanomoto e Castro (2012) descreveram estômatos anfistomáticos para *Polygala cyparissias*, *P. paniculata*, *P. angulata* e *P. violacea*, sendo *P. laureola* a única espécie com folhas hipoestomáticas.

Considerando que os achados para o subgênero *Ligustrina* são em sua maioria de folhas hipoestomáticas, e para o subgênero *Polygala* de anfistomáticas, pode-se sugerir que esta característica seja importante para a definição do subgênero, assim o resultado encontrado para

P. boliviensis reforça essa hipótese, considerando que a mesma pertence ao subgênero *Polygala* (COELHO, AGRA, BARACHO, 2008).

A *P. boliviensis* apresentou tricomas tectores unicelulares de ápice agudo, sendo que aparentemente o indumento é escasso (Figura 1A). Segundo os estudos de Solereder (1908) e Metcalfe e Chalk (1957), tricomas glandulares não foram detectados em espécies de Polygalaceae, sendo predominantes os tricomas simples unicelulares, com exceção das espécies do gênero *Bredemeyera* e *Xanthophyllum* que apresentam tricomas pluricelulares.

Os tricomas tectores estão envolvidos em funções como diminuição da perda de água e da quantidade de luz, sendo por isso muito importante na adaptação dessas plantas em ambientes áridos e semiáridos, além de servir como barreira mecânica no ataque de herbívoros (CRANG, LYONS-SOBASKI, WISE, 2018). Dessa forma, a presença desses tricomas em *P. boliviensis* pode ser, assim como a presença de cutícula e estômatos nas duas faces, uma estratégia para a adaptação da espécie ao local de ocorrência.

Outros estudos com espécies de *Polygala* corroboram com os resultados obtidos para *P. boliviensis*, a exemplo de Marques e Peixoto (2007) que relataram tricomas em *Polygala spectabilis* DC. var. *spectabilis* e *Polygala spectabilis* var. *amazonensis*; Aguiar, Marques e Yanomoto (2008) descreveram a presença de tricomas simples, retos e adpressos para espécies do gênero *Polygala* subg. *Hebeclada* (Chodat) Blake, destacando *P. hirsuta*; Aguiar-Dias, Yanomoto e Castro (2012) demonstraram a presença de tricomas tectores unicelulares de ápice agudo também em *P. violacea* e *P. laureola*; e Bejenaru et al (2017) que citaram tricomas tectores unicelulares em *P. vulgaris*.

Tricomas tectores de ápice dilatado com prolongamento lateral foram encontrados para espécies de *Polygala*, como para *P. angulata* e *P. paniculata*, já a espécie *P. cyparissias* apresentou-se como glabra (AGUIAR-DIAS, YANOMOTO, CASTRO, 2012), diferenciando-se dos resultados de *P. boliviensis*. Outras espécies do gênero *Polygala* foram classificadas como glabras ou pubérulas. Lima et al. (2018) realizou apenas descrição morfológica das espécies do Ceará, e afirmou que as folhas são glabras, com exceção de *P. sedoides* e *P. appendiculata* com folhas pubérulas.

Já Pastore (2016) afirmou a presença de tricomas glandulares nas folhas de *Polygala minarum*, nova espécie brasileira encontrada no estado de Minas Gerais. No entanto, por se tratar de estudo morfológico, não se sabe se ele levou em consideração apenas o formato para tal classificação, podendo se referir a um tricoma de ápice dilatado, como descrito por Aguiar-Dias, Yanomoto e Castro (2012).

O mesófilo da *P. boliviensis* é dorsiventral com parênquima paliçádico uniestratificado e parênquima lacunoso pluriestratificado (Figura 1A, Figura 1B). Esse tipo de mesófilo é o predominante nas espécies de Polygalaceae (SOLEREDER,1908; METCALFE, CHALK, 1957). Teng et al. (2009) encontrou a mesma estrutura para *P. tenuifolia*, assim como Bejenaru et al. (2017) para *P. vulgaris*. Aguiar-Dias, Yanomoto e Castro (2012) também descreveram estruturas semelhantes em *P. laureola*, *P. paniculata*, *P. angulata* e *P. violacea*, e apenas *P. cyparissias* mostrou mesófilo homogêneo, distinguindo-se das demais espécies.

As folhas de *P. boliviensis* apresentaram uma ou duas cavidades secretoras (Figura 1C). Essas estruturas possuem contorno esférico a oval, com epitélio descontínuo, unisseriado, formado por células arredondadas de parede delgada, delimitando o lúmen, que possui formato isodiamétrico. As cavidades observadas, localizam-se no parênquima lacunoso, entre a nervura central e feixes vasculares periféricos.

O desenvolvimento dessas cavidades possui aspecto lisígeno, semelhante de outras espécies do gênero *Polygala* que comumente apresentam cavidades lisígenas, cuja principal secreção relatada são óleos (CHODAT, 1891; SOLEREDER,1908; METCALFE, CHALK, 1957). No entanto, Aguiar-Dias, Yanomoto e Castro (2012) só encontraram esse tipo de cavidade para *P. paniculata*. Outras estruturas secretoras descritas por esses autores, como idioblastos secretores, não foram detectadas para *P. boliviensis*.

O sistema vascular da *P. boliviensis* é constituído por um único feixe vascular na nervura principal, colateral e sem esclerênquima perivascular, além feixes vasculares periféricos de menor calibre, delimitados por uma bainha parenquimática (Figura 1B, Figura 1C).

A falta de esclerênquima nas folhas das espécies de Polygalaceae já tinha sido relatada anteriormente por Solereder (1908), Metcalfe e Chalk (1957). Aguiar-Dias, Yanomoto e Castro (2012) citaram o mesmo padrão no sistema vascular das cinco espécies de *Polygala* estudadas, com exceção da *P. laureola* que apresenta colênquima. Já Bejenaru et al. (2017) descrevem semelhante sistema vascular para *P. vulgaris*, com diferença na presença de esclerênquima na região perifloêmica.

As células esclerenquimáticas têm, dentre outras funções, a de sustentação (CRANG, LYONS-SOBASKI, WISE, 2018). Para a espécie *P. boliviensis*, essas não foram observadas nas folhas, o que pode ser justificado pelo tamanho das folhas da espécie, que por serem pequenas, não necessitam desse tipo de tecido. Analisando a espécie *P. laureola* estudada por Aguiar-Dias, Yanomoto e Castro (2012) e *P. vulgaris*, avaliada por Bejenaru et al. (2017), para as quais foram descritos colênquima e esclerênquima nas folhas, nota-se que o tamanho destas é superior, quando comparadas à *P. boliviensis*.

Além disso, a *P. boliviensis* apresenta ciclo de vida anual e, eventualmente, bianual. De acordo com Soderstrom (1967) espécies anuais apresentam menor quantidade de esclerênquima em lâminas foliares, podendo justificar a ausência desse tecido na espécie em estudo. No entanto, a duração do ciclo de vida pode não ser fator definitivo ou exclusivo para determinação desse aspecto (PELEGRIN, LONGHI-WAGNER; OLIVEIRA, 2009).

O pecíolo da *P. boliviensis* mostra contorno plano-convexo e epiderme unisseriada (Figura 1D). Tricomas tectores unicelulares de ápice agudo também foram observados. O tecido fundamental está constituído por várias camadas de parênquima fundamental e feixe vascular único em arco tênue, semelhante aos achados de Aguiar-Dias, Yanomoto e Castro (2012) para *P. paniculata*, e distinguido-se de *P. laureola* e *P. violacea* que exibiu pecíolo com contorno circular. Segundo Solereder (1908), Metcalfe e Chalk (1957), as espécies de Polygalaceae costumam ter pecíolo simples com um único feixe vascular. Lima et al. (2018) indicou que *P. appendiculata* exhibe pecíolo pubérulo e *P. trichosperma*, glabro.

4.3.2 Anatomia do caule

A espécie *P. boliviensis* apresenta caule aéreo em estrutura primária (Figura 2.A-E) e secundária (Figura 2.F-H).

O caule em estrutura primária tem contorno circular, epiderme unisseriada e tricomas tectores de ápice agudo (Figura 2A) ou falciforme (Figura 2C). Não foram observados estômatos. A região cortical contém cerca de quatro camadas de colênquima, seguido de parênquima fundamental e células esclerenquimáticas, delimitando o cilindro vascular (Figura 2A). O caule é do tipo eustelo, e o procâmbio tem atividade bidirecional, com xilema primário para dentro e floema primário para fora (Figura 2B). A região medular é ampla e constituída por parênquima fundamental (Figura 2A). No corte longitudinal, foi possível visualizar a presença de elementos de vasos com deposição de lignina no padrão espiralados e pontilhados (Figura 2D), com placas de perfuração simples, bem como fibras perivasculares (Figura 2E).

O caule em estrutura secundária tem contorno circular (Figura 2F) com epiderme unisseriada sem a formação de felogênio (Figura 2G). Apresenta cutícula, tricomas unicelulares de ápice dilatado (Figura 2H), além de estômatos distribuídos por todo eixo vegetativo (Figura 2H). O parênquima cortical tem cerca de três camadas incluindo parênquima clorofiliano e fundamental, seguido de um anel descontínuo de duas camadas de fibras esclerenquimáticas delimitando o cilindro vascular. O sistema vascular é do tipo fechado e colateral, com floema voltado para a parte externa e xilema para a parte interna (Figura 2H). A região medular é formada por parênquima fundamental (Figura 2G, Figura 2H).

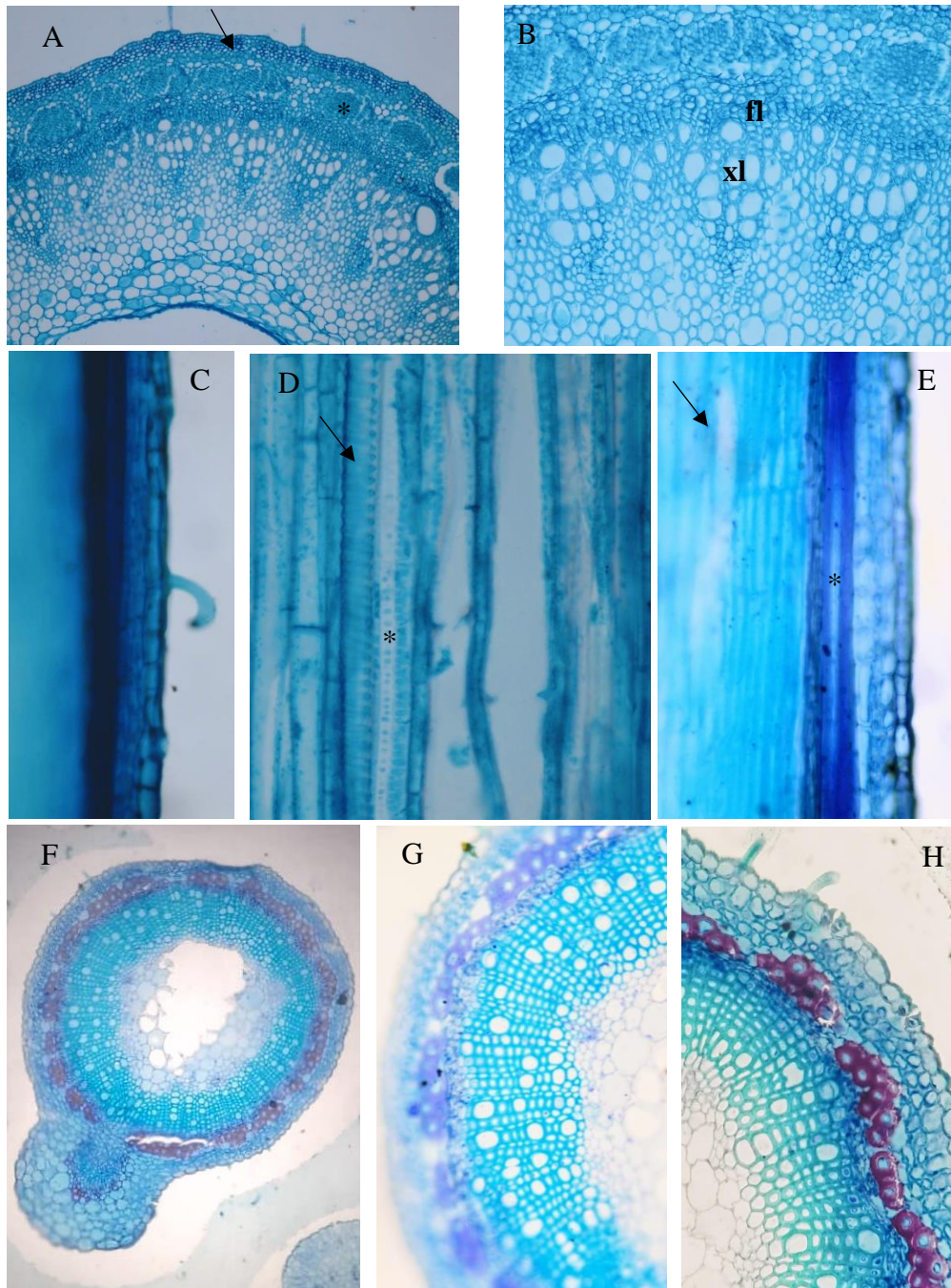


Figura 2 – Anatomia do caule de *Polygala boliviensis*

A-E. Caule em estrutura primária; A. Vista geral. Epiderme unisseriada, tricomas, colênquima (seta), esclerênquima (*), parênquima fundamental. Corte transversal. Aumento 10X. B. Corte transversal. Xilema (xl) e floema (fl) primário. Aumento 20X. C. Tricoma falciforme. Corte longitudinal. Aumento 40X. D. Vasos espiralados (seta) e pontilhados (*). Corte longitudinal. Aumento 40X. E. Vista geral; placas de perfuração simples (seta), fibras (*). Corte longitudinal. Aumento 40X. F-H. Caule em estrutura secundária; C-D. Vista geral. Corte transversal. Aumento 10X (F), 20X (G). H. Cutícula, epiderme unisseriada, estômatos, tricoma de ápice dilatado, fibras esclerenquimáticas, xilema secundário. Corte transversal. Aumento 40X.

Aguiar-Dias (2008) analisou o caule de cinco espécies de *Polygala*, detectando para todas, epiderme unisseriada e ausência de felogênio. A presença de estômatos só foi observada para *P. cyparissias*, *P. laureola* e *P. angulata*, sendo que para as duas últimas, exclusivamente, no caule secundário, concordando com os achados de *P. boliviensis*. Teng et al. (2009)

encontraram estômatos no caule de *P. tenuifolia*, enquanto Bejenaru et al. (2017) descreveram para *P. vulgaris* epiderme unisseriada, com deposição de cutícula e estômatos. No entanto, nesses estudos os autores não fazem referência se o caule analisado tinha estrutura primária ou secundária.

Aguiar-Dias (2008) relata a presença de tricomas não glandulares de ápice agudo unicelulares em *P. laureola*, e uni ou pluricelulares em *P. violaceae*, tricomas não glandulares com ápice dilatado e prolongamento lateral em *P. paniculata* e *P. angulata*, e apenas a *P. laureola* não apresentou tricomas. Teng et al. (2009) descreveram tricomas presentes no caule de *P. tenuifolia*, e Bejenaru et al. (2017), tricomas tectores unicelulares para *P. vulgaris*.

Tricomas tectores falciformes no caule de *P. boliviensis* foram observados, anteriormente, por Lima et al. (2018), que também caracterizou outras espécies de *Polygala* do Ceará, encontrando algumas espécies com caules glabros, como *P. appendiculata* e *P. trichosperma*, caules glabros ou laxamente pubérulo em *P. sedoides* e *P. gracilis*, tricomas glandulares em *P. celosioides* e *P. glochidiata*, e *P. longicaulis* e *P. paniculata* com tricomas lepidotos.

Os resultados descritos para *P. boliviensis* concordam com a maioria dos achados, nos quais diferentes autores citam a presença de tricomas de cobertura para os órgãos vegetativos de espécies de *Polygala* e Polygalaceae (CHODAT, 1891; SOLEREDER, 1908; METCALFE, CHALK, 1957; AGUIAR, MARQUES, YANAMOTO, 2008; MARQUES, PEIXOTO, 2007).

Apesar da concordância em parte dos achados, Marques (1979) afirma a presença de tricomas glandulares em *P. paniculata*, *P. itatiaiae*, *P. revoluta*, *P. glazioui*, *P. pulchella*, *P. campestres* e *P. comata*, assim como Lima et al. (2018). No entanto, esses estudos são exclusivamente taxonômicos, analisando apenas a morfologia dos tricomas, não os caracterizando através de estudos anatômicos ou histoquímicos, para que se tenha certeza da função glandular desses tricomas.

No estudo de Aguiar-Dias (2008), as espécies do subgênero *Polygala* mostraram tricomas com ápice dilatado, da mesma forma que em *P. boliviensis*, que também pertence a esse subgênero. No mesmo trabalho, as demais espécies pertencentes a outros subgêneros apresentaram tricomas de ápice agudo, podendo esta ser então uma característica específica das espécies do gênero *Polygala* subg. *Polygala*.

Aguiar-Dias (2008) relatou a presença de parênquima clorofiliano e/ou fundamental na região medular do caule primário e secundário de *P. cyparissias*, *P. laureola*, *P. angulata* e *P. violaceae*, sendo a *P. paniculata* a única que apresentou colênquima no caule primário e esclerênquima no caule secundário, semelhante a *P. boliviensis*. A presença de elementos

esclerêquimáticos no caule de espécies de Polygalaceae já havia sido descrita por Solereder (1908) e Metcalfe e Chalk (1957), concordando com os resultados observados. Bejenaru et al. (2017) também encontraram a presença de fibras esclerenquimáticas na região perifloêmica de *P. vulgaris*.

Segundo Solereder (1908) e Metcalfe e Chalk (1957), toda a família Polygalaceae exibem sistema vascular formando um raio fechado, e os caules jovens com cinco vasos colaterais. No estudo realizado por Aguiar-Dias (2008), o estelo do sistema caulinar de *P. cyparissias* foi classificado como sifonoestelo e das demais espécies, como eustelo, assim como observado para a *P. boliviensis*.

Teng et al. (2009) também detectaram um feixe vascular circular para *P. tenuifolia* com presença de fibras perivasculares. Do mesmo modo, Bejenaru et al. (2017) descreveram que os tecidos condutores de *P. vulgaris* são organizados em anéis concêntricos, com floema na parte externa e xilema na região interna.

Os autores citaram ainda que a região medular é composta por parênquima fundamental (BEJENARU et al., 2017). Do mesmo modo, a região medular das espécies *P. cyparissias*, *P. laureola*, *P. paniculata*, *P. angulata* é composta por parênquima fundamental, diferenciando-se, apenas, da *P. violaceae* que mostrou parênquima amilífero (AGUIAR-DIAS, 2008). Dessa forma, observa-se que os resultados encontrados para *P. boliviensis* corroboram com estudos anteriores para outras espécies do gênero *Polygala*.

Espécies de diferentes gêneros de Polygalaceae apresentam fibras perivasculares e elementos de vaso com perfuração simples, além de vasos espiralados para espécies de *Polygala* (SOLEREDER, 1908; METCALFE, CHALK, 1957). Aguiar-Dias (2008) observou elementos de vaso espiralados para *P. cyparissias* e placas de perfuração simples de para *P. leureola* e *P. paniculata*. Já Telitsyna et al. (2018) encontraram a presença de fibras perivasculares não lignificadas em *P. anatolica* e *P. albowii*, mostrando que essa característica é bastante comum nas espécies de *Polygala*, o que também foi demonstrado para *P. boliviensis*.

4.3.3 Histoquímica da folha

De acordo com os testes histoquímicos aplicados para a espécie *P. boliviensis*, constatou-se que a secreção é exclusivamente lipídica, o que pode ser visualizado pelo resultado positivo com o reagente Preto de Sudan B, para folha (Figura 3).

Nas folhas, a secreção foi observada apenas nas células epiteliais da cavidade secretora (Figura 3A, Figura 3B), não sendo encontrada no lume, assim como descrito para *P. paniculata* (AGUIAR-DIAS, YANOMOTO, CASTRO, 2012). Apesar de autores como Chodat (1891),

Solereider (1908), Metcalfe e Chalk (1957), e Aguiar-Dias, Yanomoto e Castro (2012) evidenciaram a presença de cavidades secretoras nas folhas de espécies de *Polygala* e Polygalaceae, até então, as secreções dessas cavidades não tinham sido caracterizadas.

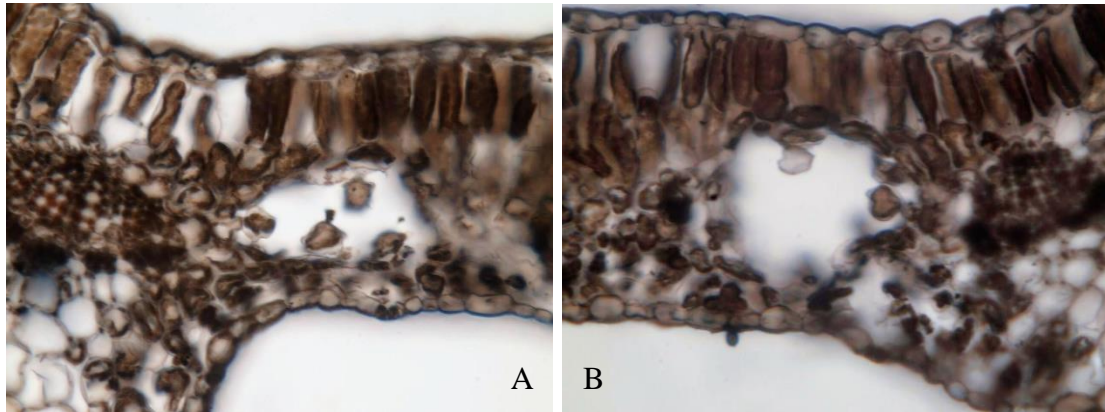


Figura 3 – Histoquímica da folha e caule de *Polygala boliviensis*

A – B. Cavidade secretora na folha com lipídios nas células epiteliais, evidenciado pela reação com Preto de Sudan B. Aumento 20X (A), 40X (B).

Apesar de diferentes substâncias já terem sido descritas para espécies de *Polygala* e Polygalaceae, não foi possível detectá-las para *P. boliviensis*, o que pode ser influenciado por diferentes fatores, a exemplo da interação entre o fluído de congelamento e os testes aplicados; ou mesmo a utilização de material vegetal fixado, podendo haver interferência do fixador com as substâncias secretadas através da extração das substâncias que compõem o exsudado, e a ocorrência de resultados falso-negativo ou falso-positivo (MACEDO, 2012).

Além disso, a concentração e distribuição dos metabólitos secundários são determinantes para a detecção através dos testes histoquímicos. Normalmente, essas substâncias são produzidas em pequenas quantidades pelos vegetais (REZENDE et al., 2016) e o padrão de acumulação varia, podendo ser classificados com constitutivos, pré-formados ou indutíveis (MATSUURA et al., 2018). Assim, nem sempre os metabólitos estão presentes em quantidades detectáveis, sendo produzidos em maior quantidade por algum estímulo ambiental.

Outro aspecto importante é a distribuição, visto que diferentes etapas da biossíntese podem se dar em estruturas subcelulares, tecidos ou órgãos distintos. Alguns metabólitos são ainda armazenados em locais específicos, como estruturas secretoras (MATSUURA et al., 2018), sendo por isso mais facilmente detectados nessas estruturas, nas quais estariam concentrados.

No entanto, as cavidades poderiam estar em uma fase pré ou pós-secretora, impedindo a detecção desses metabólitos. De acordo com Thomas (1991), os lipídios são predominantes nas células epiteliais nos estágios pré-secretoras, como foi detectado para as cavidades de *P. boliviensis*.

Normalmente esses metabólitos são encontrados em gotículas nas células, atuando como importante forma de armazenamento de carbono para os diferentes processos celulares. Comumente gotas lipídicas são formadas por triacilgliceróis e estéres de esteróis, cercadas de fosfolípídeos e proteínas, e são usados na produção de energia pelos peroxissomos através da via de β -oxidação (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2020).

4.4 Conclusão

A descrição anatômica e histoquímica da *Polygala boliviensis* trouxe resultados inéditos. A espécie exibe características análogas a outras espécies do gênero *Polygala*, subgênero *Polygala* e da família Polygalaceae, o que mostra como essa avaliação também se faz importante nas delimitações taxonômicas.

Estruturas que favorecem a adaptação ao ambiente foram identificadas na *P. boliviensis*, dessa forma, a espécie mostra-se bastante adaptada ao ambiente da Caatinga, no qual está abundantemente distribuída. Além disso, a presença de lipídios nas cavidades secretoras das folhas, contribuem para a caracterização da espécie, tão pouco estudada até o momento, e colabora com a identificação da mesma, facilitando a diferenciação entre espécies morfológicamente semelhantes.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A.C.A.; MARQUES, M.C.M.; YAMAMOTO, K. Taxonomia das espécies de *Polygala* L. subg. *Hebeclada* (Chodat) Blake (Polygalaceae) ocorrentes no Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, p. 81-109, 2008.
- AGUIAR-DIAS, A.C.A. **Estudos morfológicos em cinco espécies de *Polygala* L. (Polygalaceae) com ênfase nas estruturas secretoras**. 2008. 239 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- AGUIAR-DIAS, A.C.A.; YAMAMOTO, K.; CASTRO, M.M. Anatomia foliar de cinco espécies de *Polygala* de restinga e cerrado. **Rodriguésia**, v. 63, p. 395-404, 2012.
- AGUIAR-DIAS, A.C.A.; YAMAMOTO, K.; CASTRO, M.M. Stipular extranuptial nectaries new to *Polygala*: morphology and ontogeny. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 166, p. 40–50, 2011.
- BEJENARU, C. et al. Histo-anatomical and preliminary chromatographic analysis on *Polygala vulgaris* L. (Polygalaceae) species. **Annals of the University of Craiova - Agriculture, Montanology, Cadastre Series**, v. XLVII, 2017.
- CHODAT, R. Monographia Polygalacearum I. **Mémoires de la Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève**, v. 31, p. 1-143, 1891.

COELHO, V.P.M.; AGRA, M.F.; BARACHO, G.S. Flora da Paraíba, Brasil: *Polygala* L. (Polygalaceae). **Acta botânica brasílica**, v. 22, p. 225-239, 2008.

CRANG, R.; LYONS-SOBASKI, S.; WISE, R. **Plant anatomy**: a concept-based approach to the structures of seeds plants. Cham: Springer, 2018.

DAVID, R., CARDE, J.P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 258, p. 1338-1340, 1964.

FISHER, D.B. Protein Staining of Ribboned Epon Sections for Light Microscopy. **Histochemie**, v.16, p. 92-96, 1968.

FONSECA, M.C.M.; MEIRA, R.M.S.A.; CASALI, V.W.D. Anatomia dos órgãos vegetativos e histolocalização de compostos fenólicos e lipídicos em *Porophyllum ruderale* (Asteraceae). **Planta Daninha**, v. 24, p. 707-713, 2006.

FURR, M.; MAHLBERG, P. G. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products**, v. 44, p.153-159, 1981.

GABE, M. **Techniques Histologiques**. Paris: Massie e Cie, 1968.

GEISSMAN, T.A.; GRIFFIN, T.S. Sesquiterpene lactones: Acid-catalysed color reactions as an aid in structure determination. **Phytochemistry**, v.10, p. 2475-2485, 1971.

HIGH, O.B. **Lipid histochemistry**. New York: Oxford University Press, 1984.

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

LACAILLE-DUBOIS; M-A.; DELAUDE, C.; MITAINE-OFFER, A-C. A review on the phytopharmacological studies of the genus *Polygala*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 249, 112417, 2020.

LILLIE, R.D. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. 3 ed. New York: McGraw Hill, 1965.

LIMA, I.G. et al. Flora do Ceará, Brasil: Polygalaceae. **Rodriguésia**, v. 69, p. 673-692, 2018.

MACE, M.E.; HOWELL, C.R. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology**, v.23, p. 99-108, 1974.

MACEDO, T. P. **Anatomia e histoquímica foliolar de duas espécies de *Zanthoxylum* Linn. (Rutaceae) da Mata Atlântica, BA**. 2012. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.

MARENGO, J.A. et al. Variabilidade e mudanças climáticas no semiárido brasileiro. In: GHEYI, H.R. et al. **Recursos hídricos em regiões áridas e semiáridas**, Campina Grande, PB: Instituto Nacional do Semiárido, Cruz das Almas, BA: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2012. p. 384-422.

MARQUES, M.C.M. Revisão das espécies do gênero *Polygala* L. (Polygalaceae) do Estado do Rio de Janeiro. **Rodriguésia**, v. 31, p. 69-340, 1979.

MARQUES, M.C.M.; PEIXOTO, A.L. Estudo taxonômico de *Polygala* subgênero *Liguistrina* (Chodat) Paiva (Polygalaceae). **Rodriguésia**, v. 58, p. 95-146, 2007.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C. et al. Reserve lipids and plant autophagy. **Journal of Experimental Botany**, v. 71, p. 2854–2861, 2020.

MATSUURA, H.N. et al. Specialized plant metabolism characteristics and impact on target molecule biotechnological production. **Molecular Biotechnology**, v. 60, p.169-183, 2018.

MCMANUS, J.F.A. Histological and histochemical use of periodic acid. **Stain Technology**, v. 23, p. 99-108, 1948.

MEIRA, R.M.S.A.; MARTINS, F.M. Inclusão de material herborizado em Historesina. **Revista Árvore**, v. 27, p. 109-112, 2003.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. v.1, Oxford: Clarendon Press, 1957.

MOTT, K.A.; GIBSON, A.C.; O'LEARY, J.W. The adaptive significance of amphistomatic leaves. **Plant Cell Environ**, v.5, p. 455–460, 1982.

O'BRIEN, T.P.; MCCULLY, M.E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne: Termarcaphy Pty, 1981.

PAIVA, J.G.A. et al. Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta botânica brasileira**, v. 20, p. 257-264, 2006.

PALLARDY, S.G. Closely related wood plants. In: KOZLOWSKI, K.K. **Water deficits and plant growth**. New York: Academic press, 1981.

PASTORE, J.F. et al. **Polygalaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB20543>>. Acesso em: 08 nov. 2018.

PASTORE, J.F.B. *Polygala minarum* (Polygalaceae), a new species endemic to Southern Minas Gerais, Brazil. **Kew Bulletin**, v. 71, p. 1-5, 2016.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry theoretical and applies**. V.2, Edinburgh: C. Livingstone, 1985.

PELEGRIN, C.M.G.; LONGHI-WAGNER, H.M.; OLIVEIRA, P.L. Anatomia foliar como subsídio à taxonomia de espécies do Complexo *Briza* L. (Poaceae: Pooideae: Poeae). **Acta botânica brasileira**, v. 23, p. 666-680, 2009.

PIZZOLATO, T.D. Mayer's tannic acid- ferric chloride stain for mucins. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 21, p. 56-64, 1977.

REZENDE, F.M. et al. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. In: HIDALGO, E.M.P. et al. (Org). **VI Botânica no Inverno 2016**, São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2016, p. 93-104.

ROCHA, J.L.C. et al. Evaluation of Biological Activity of *Polygala boliviensis* in Experimental Models. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 18, p. 793-802, 2019.

ROCHA, J.L.C. et al. Quantificação de salicilato de metila em quatro gêneros de Polygalaceae por CLAE-DAD. **Química Nova**, v.35, p. 2263-2266, 2012.

SILVA, D.F. et al. Poligalen, a new coumarin from *Polygala boliviensis*, reduces the release of TNF and IL-6 independent of NF-kB downregulation. **Fitoterapia**, v. 113, p. 139-143, 2016.

SOLEREDER, H. **Systematic anatomy of the dicotyledons**: a handbook for laboratories of pure and applied botany. v.1, Oxford: Clarendon Press, 1908.

TELITSYNA, I.V. et al. Comparative research of the anatomical structure of the stem of the North Caucasian species *Polygala anatolica*, *Polygala albowii*. In: XIV Congresso da Sociedade Botânica da Rússia e Conferência "Botânica no Mundo Moderno", Makhachkala, Rússia, 2018. **Anais do XIV Congresso da Sociedade Botânica Russa e Conferência "Botânica no mundo moderno"**. Disponível em: <http://gorbotsad.ru/files/trudy_RBO_2018_T3.pdf#page=209>. Acesso em: 25 jun. 2020.

TENG, H-M. et al. Localization and Dynamic Change of Saponin in Vegetative Organs of *Polygala tenuifolia*. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 51, p. 529-536, 2009.

THOMAS, V. Structural, functional and phylogenetic aspects of the colleter. **Annals of Botany**, v. 68, p. 287-305, 1991.

VIDAL, B.C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cell Molecular Biology**, v. 22, p. 45-64, 1977.

WALKER, C.I.B. et al. Morfoanatomia e histoquímica das folhas de *Luehea divaricata* Mart. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 203-10, 2008.

SODERSTROM, T.R. Taxonomic study of subgenus *Podosemum* and section *Epicampes* of *Muhlenbergia* (Gramineae). **Contributions of the U.S. National Herbarium**, v.34, p. 75-189, 1967.

CONCLUSÃO GERAL

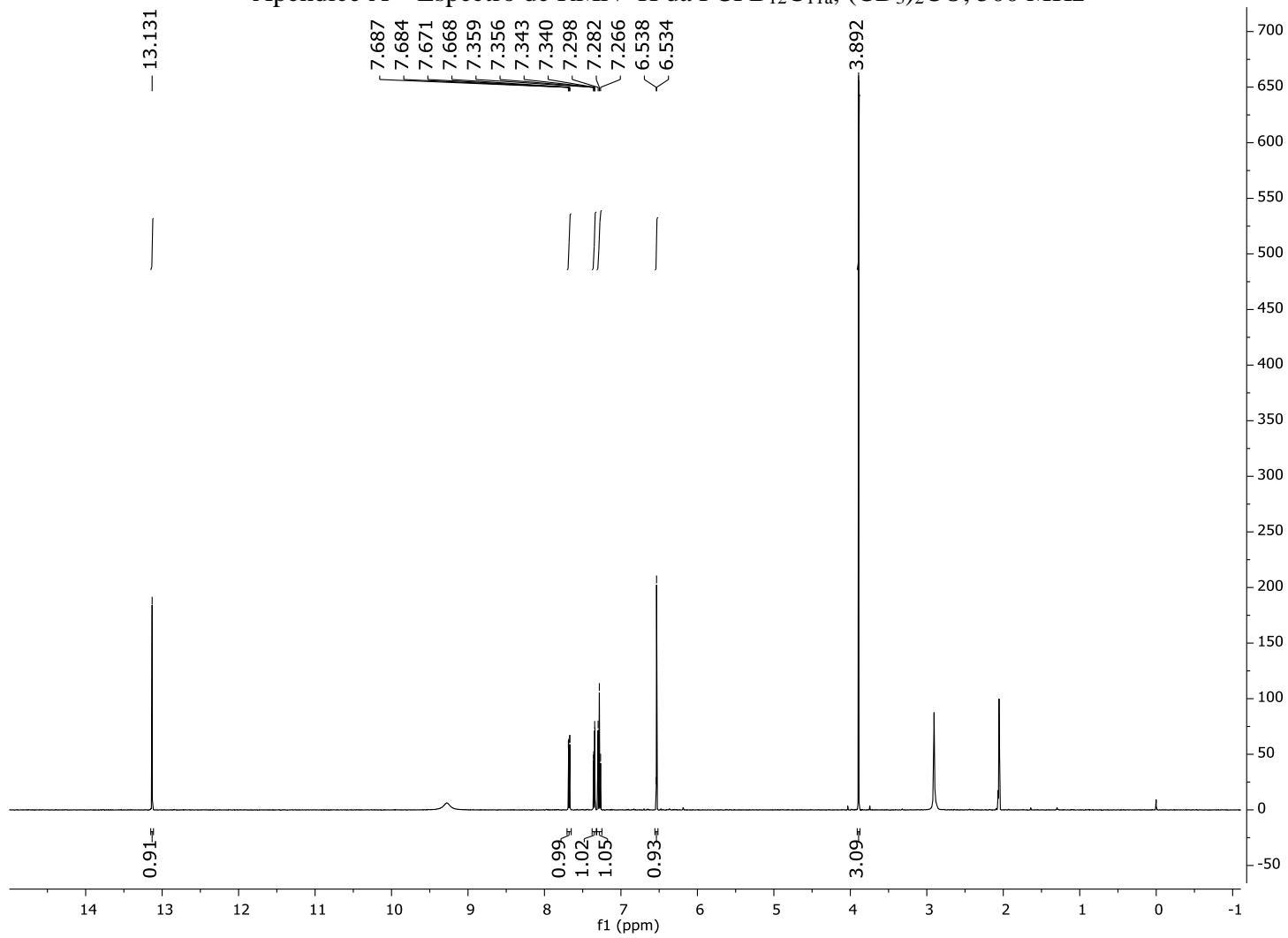
O presente estudo contribui com a caracterização química da espécie *Polygala boliviensis* através da identificação de metabólitos não descritos previamente, trazendo dados inéditos, como também corroborando com a quimiosistemática do gênero *Polygala*, que aponta cumarinas e xantonas como metabólitos representativos. Do mesmo modo, o desenvolvimento e validação do método por CLAE-DAD permite que esse seja utilizado para avaliação de extratos do gênero, facilitando caracterizações químicas de diferentes espécies.

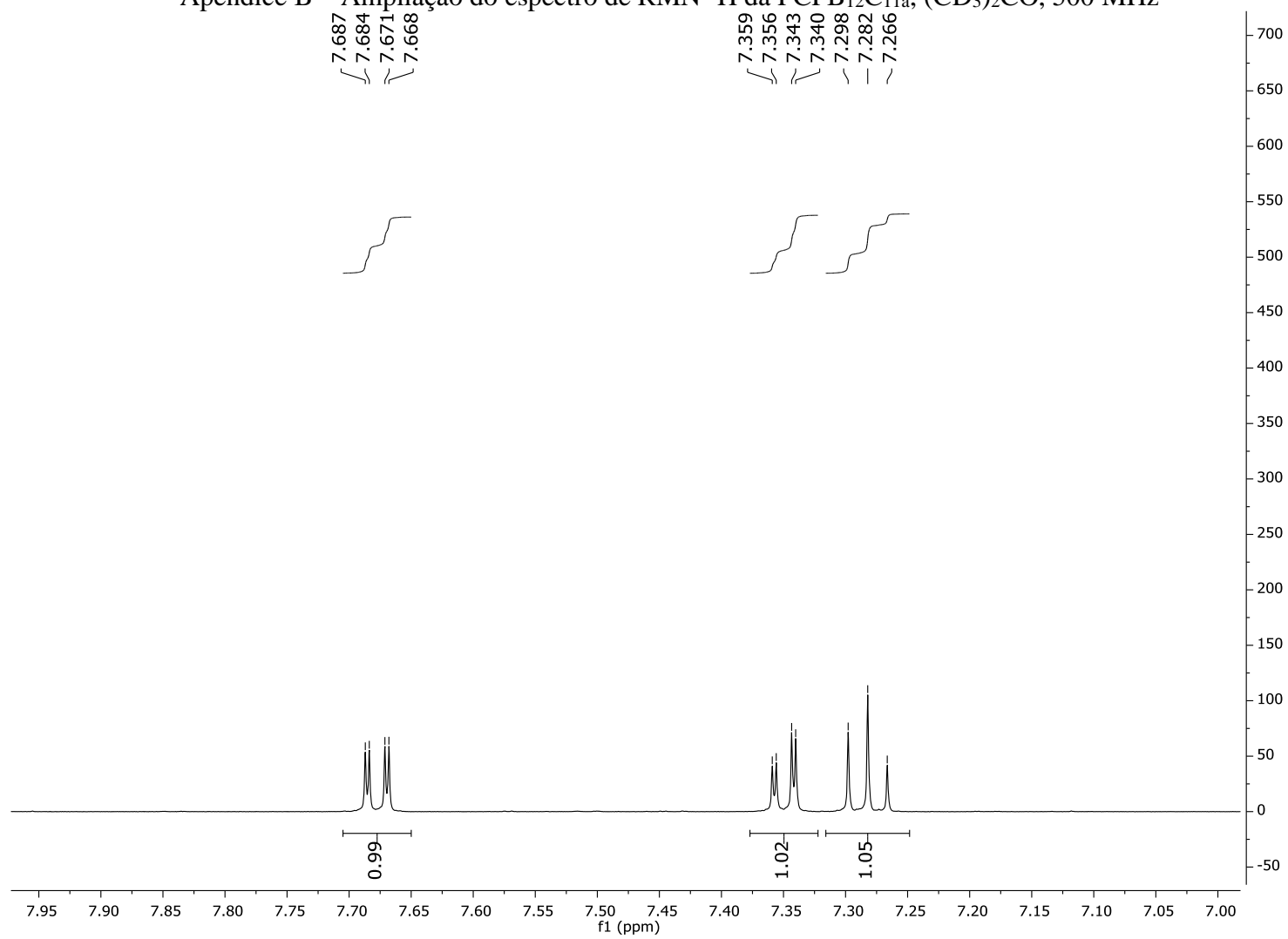
A demonstração da atividade antiplasmodial expressa pelas cumarinas aurapteno e poligaleno mostra potencial fitoterapêutico da espécie, como fonte promissora de novas moléculas bioativas. Além disso, o estudo sazonal mostra que apesar do perfil químico da espécie não variar, há uma mudança na quantidade dos metabólitos, o que influenciou também na variação da atividade e letalidade frente à *Artemia salina*, sendo possível através desses dados determinar qual o melhor período de coleta para otimização da obtenção do metabólito ou atividade de interesse.

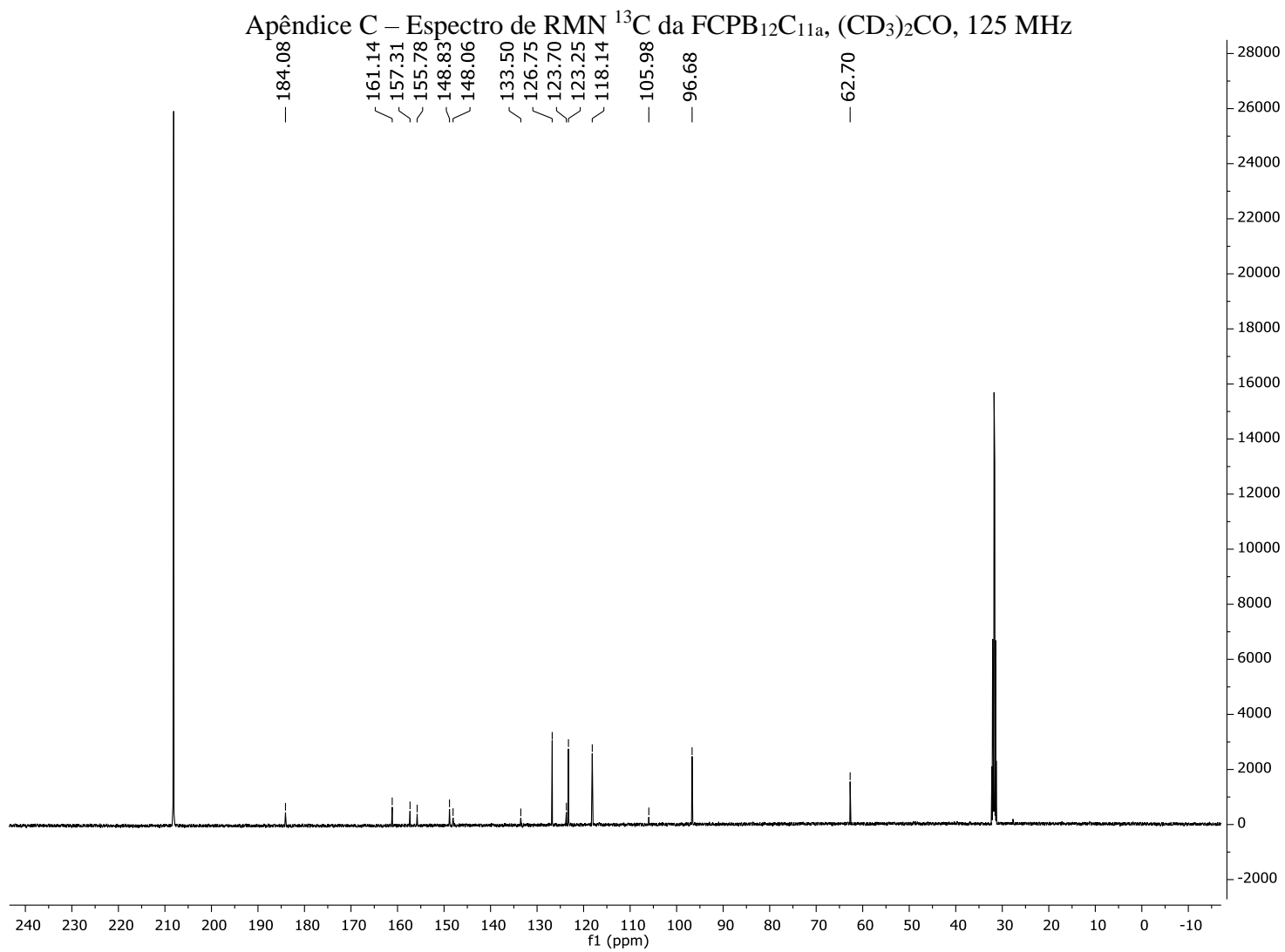
P. boliviensis apresenta características anatômicas semelhantes a outras espécies do gênero e da família, contribuindo assim para as delimitações taxonômicas, além de estruturas adaptativas a ambientes semiáridos, o que evidencia a adaptação da espécie ao ambiente em que se encontra. A espécie exibe lipídios em cavidades secretoras foliares, colaborando com sua identificação e facilitando a diferenciação entre espécies morfologicamente semelhantes.

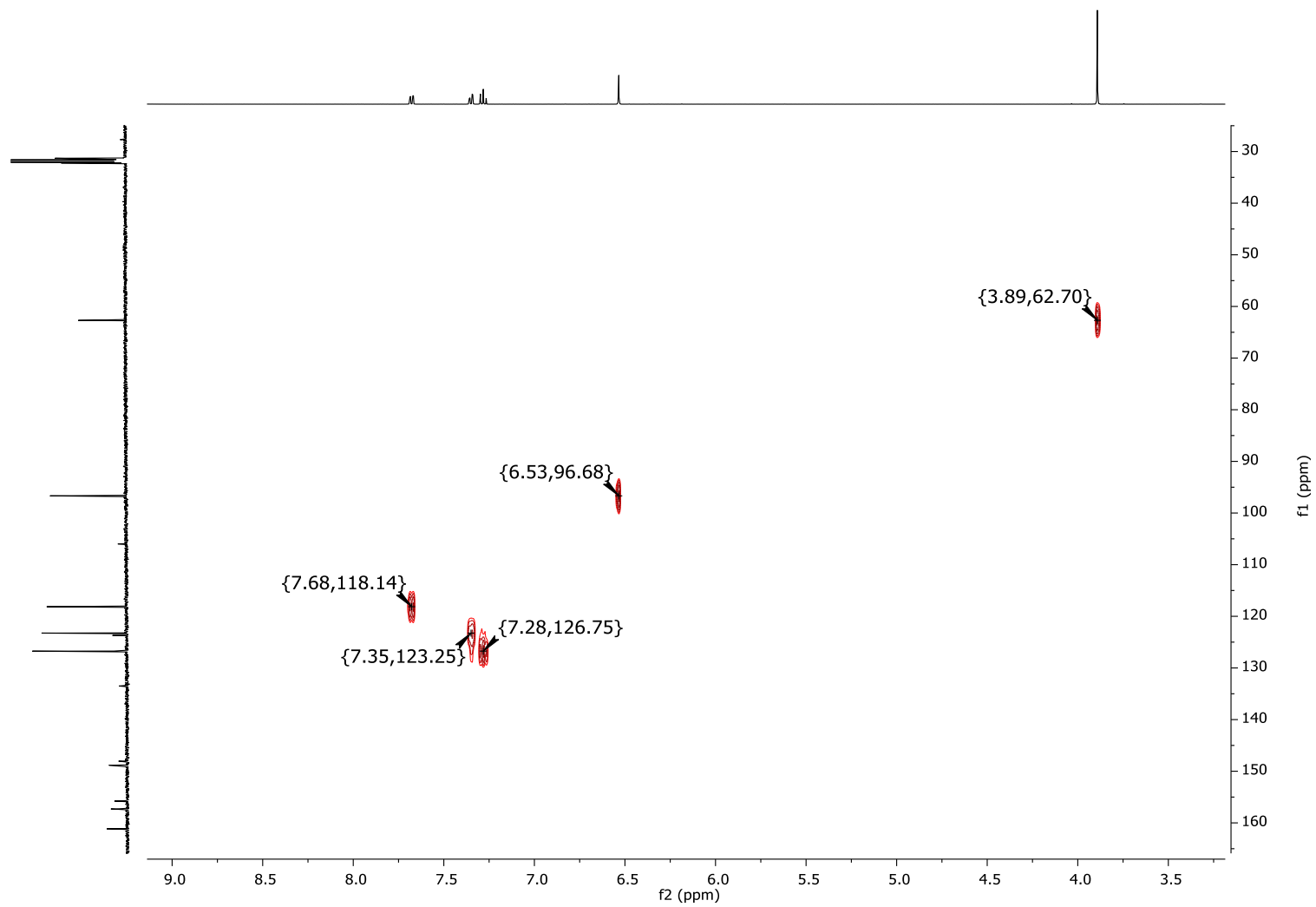
Em suma, o presente trabalho corrobora a importância do investimento de pesquisas que visem a utilização dos recursos genéticos vegetais para fins terapêuticos, visto que é evidente a riqueza de metabólitos secundários e a diversidade de propriedades terapêuticas expressas por estas substâncias provenientes das plantas, em especial, as espécies vegetais da flora brasileira e do bioma Caatinga.

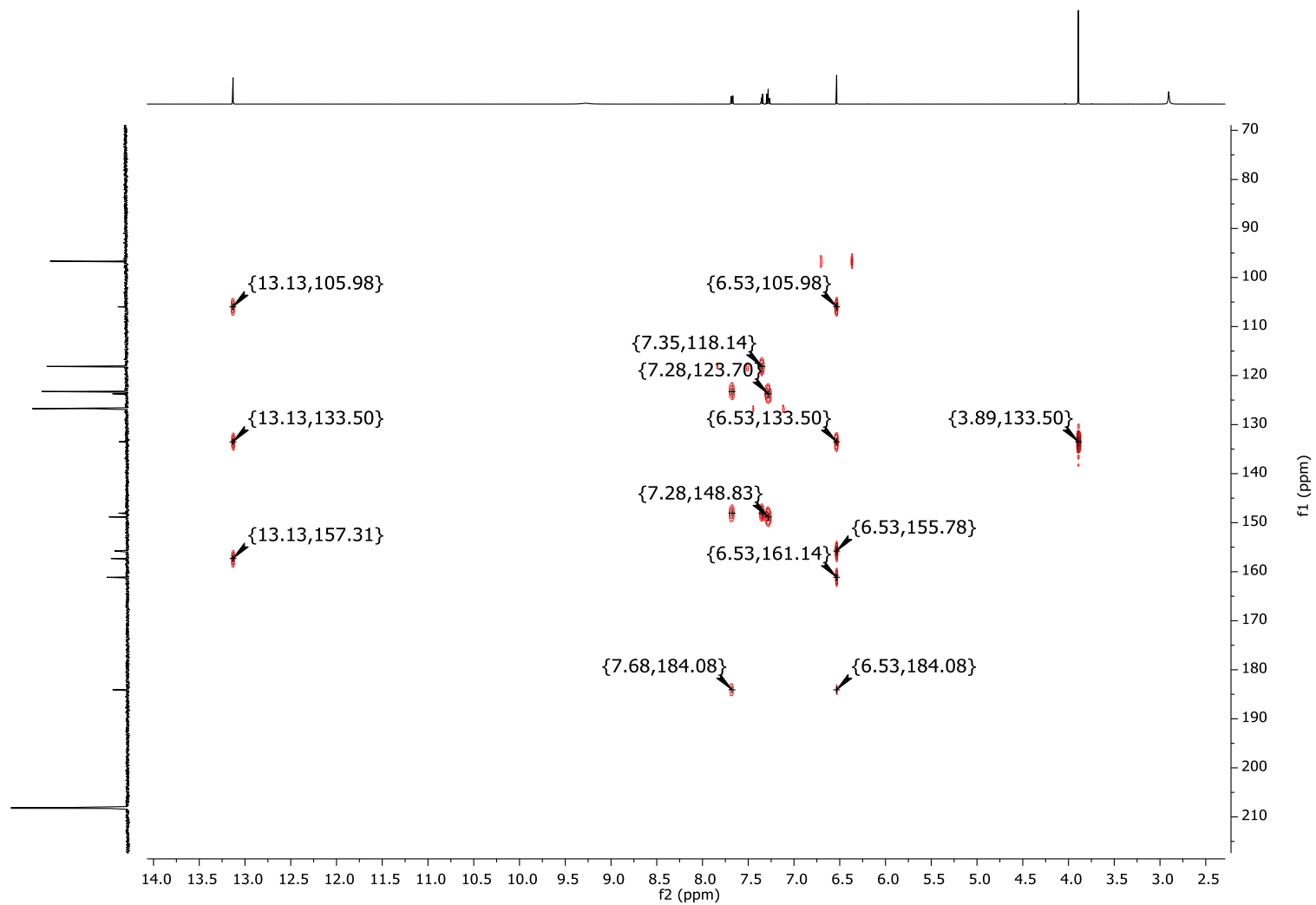
APÊNDICES

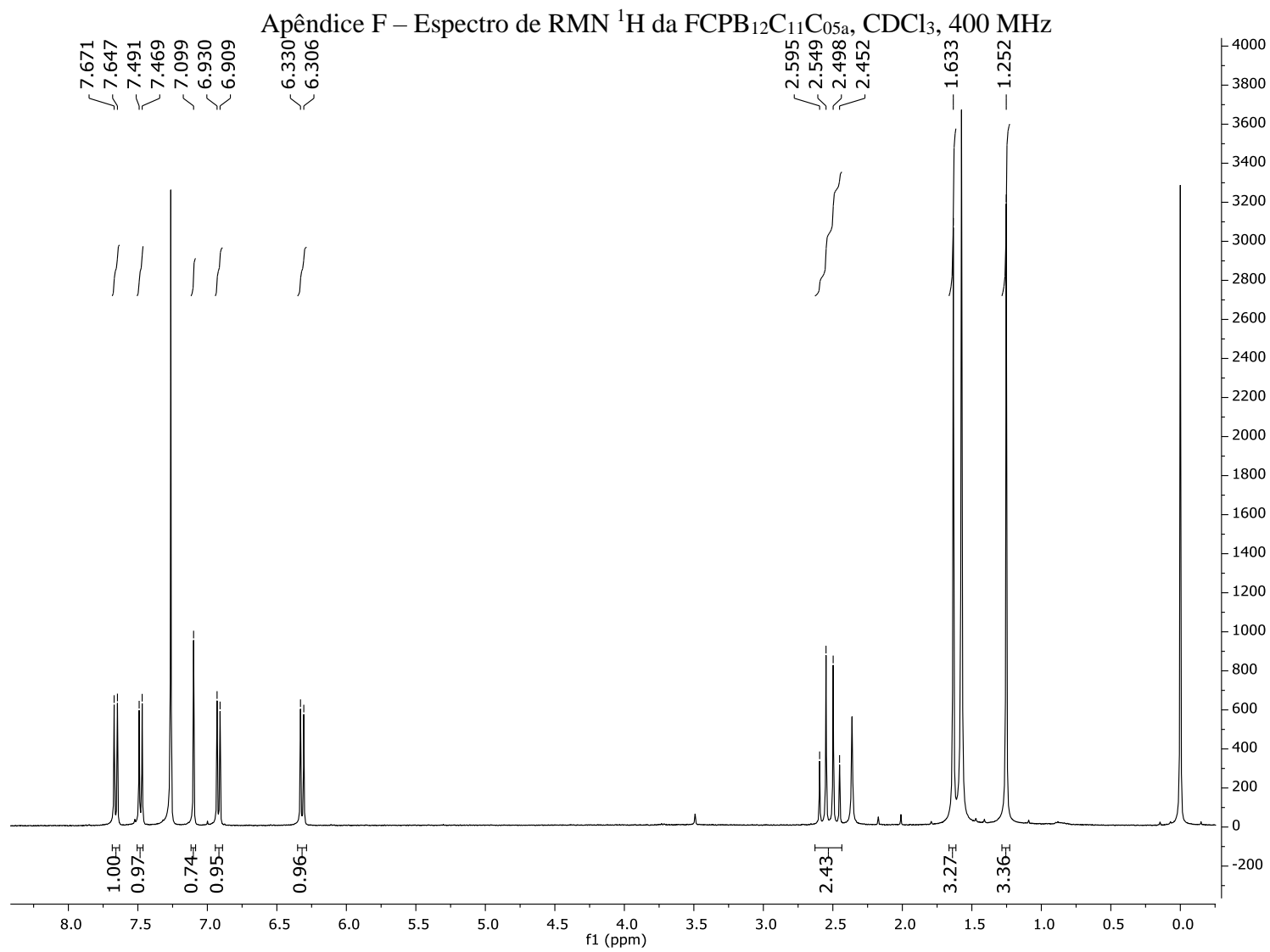
Apêndice A – Espectro de RMN ^1H da FCPB $_{12}$ C $_{11a}$, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz

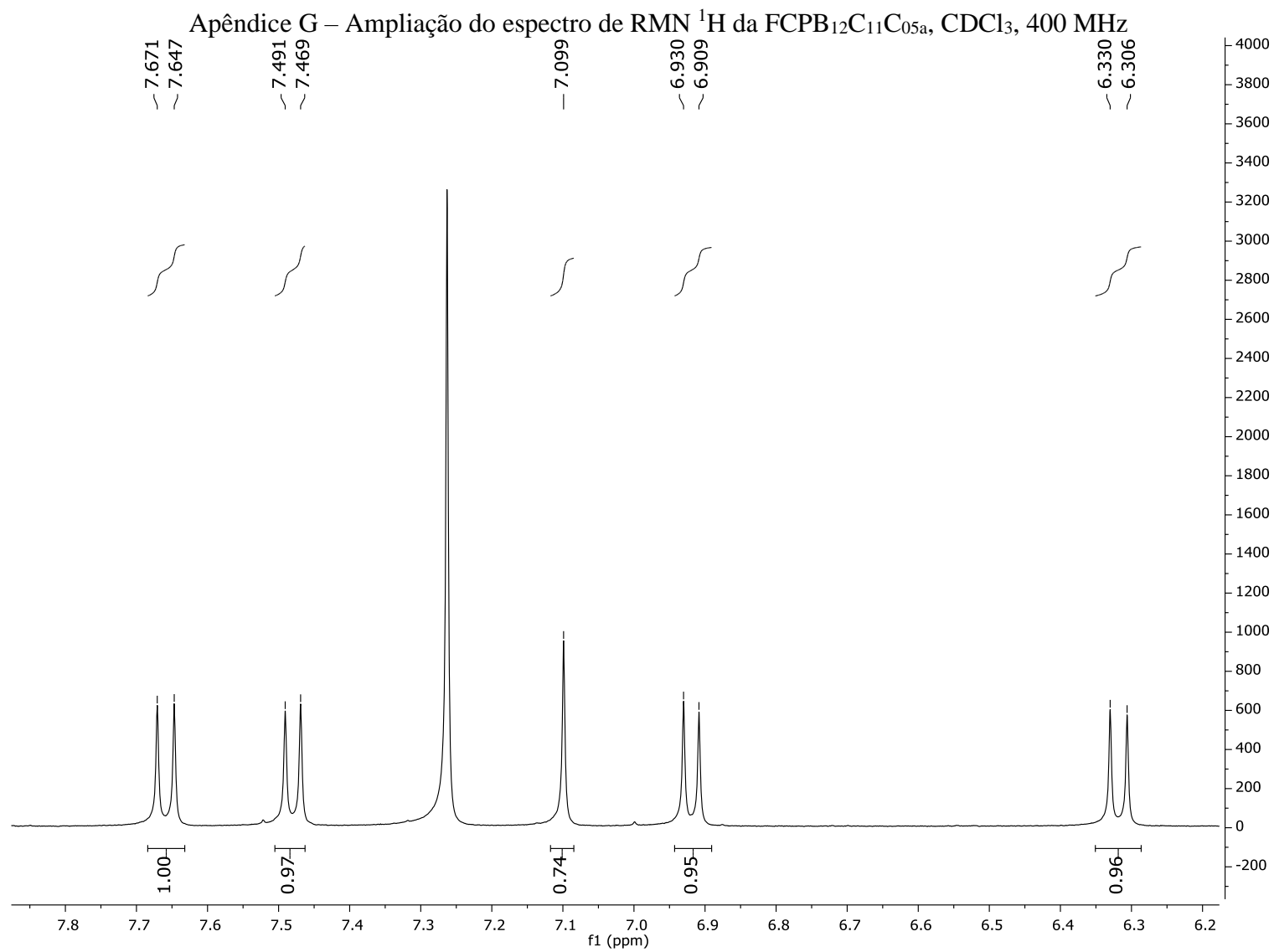
Apêndice B – Ampliação do espectro de RMN ^1H da FCPB $_{12}\text{C}_{11a}$, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 500 MHz

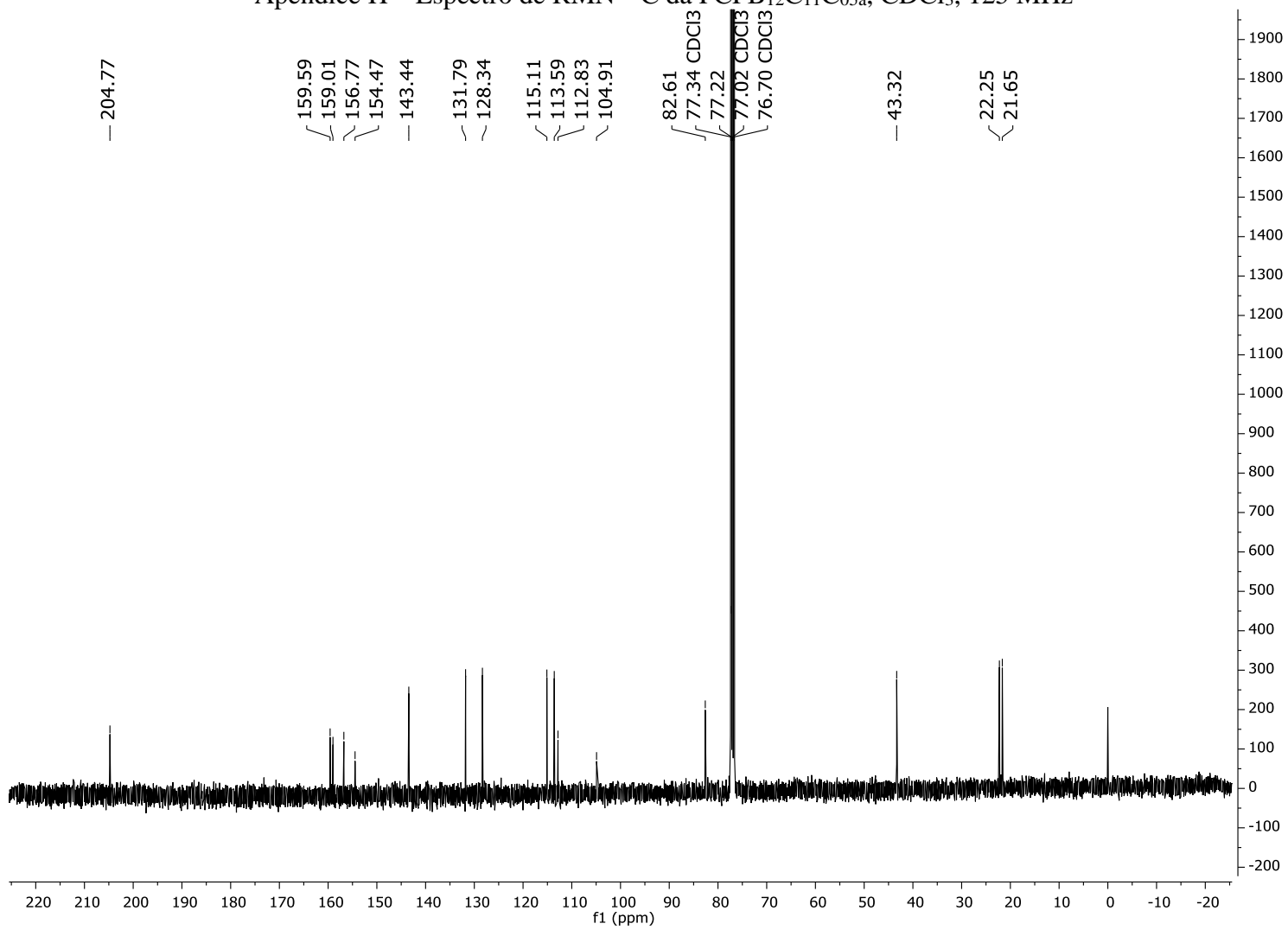


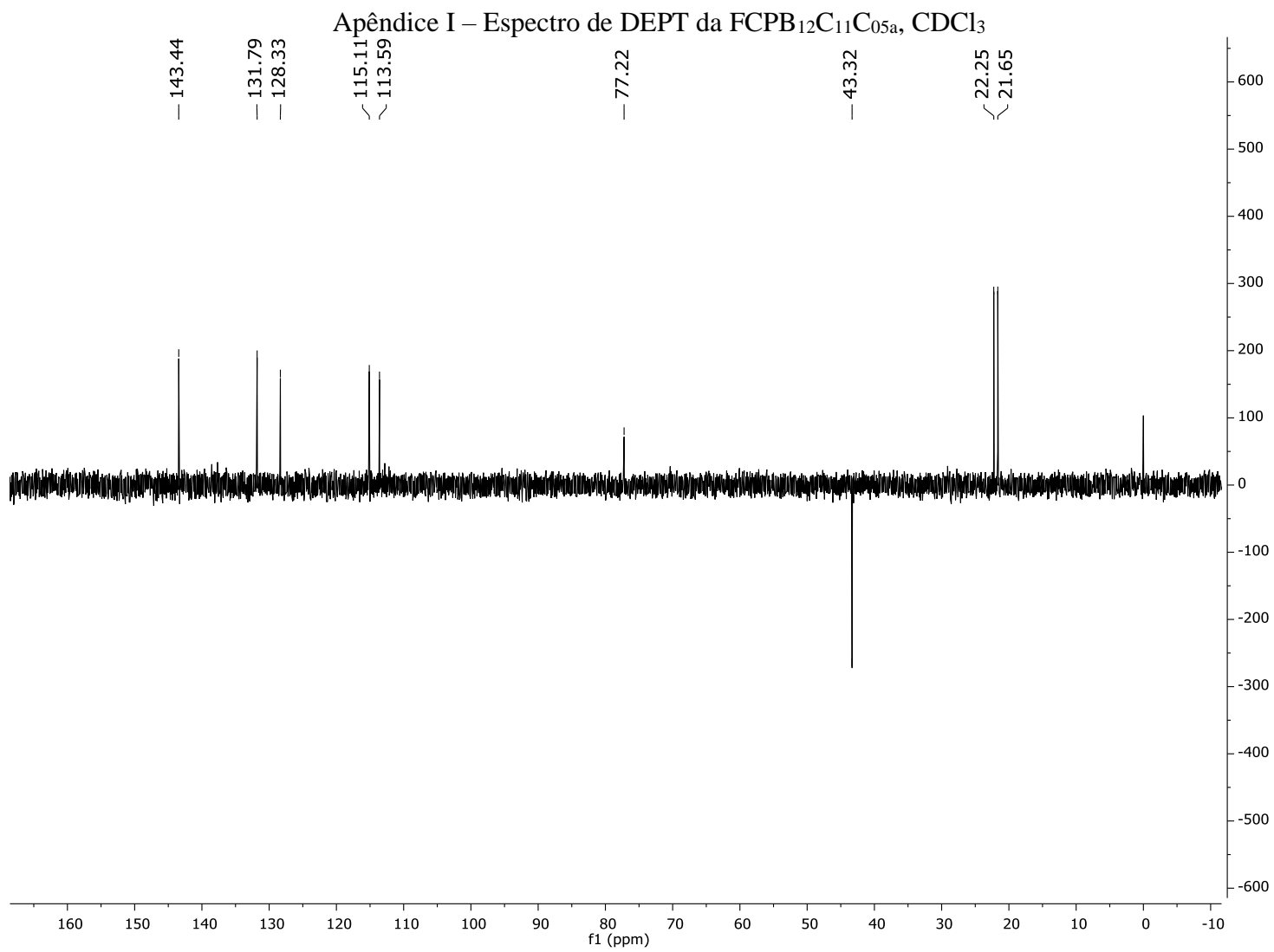
Apêndice D – Espectro de HMQC da FCPB₁₂C_{11a}, (CD₃)₂CO

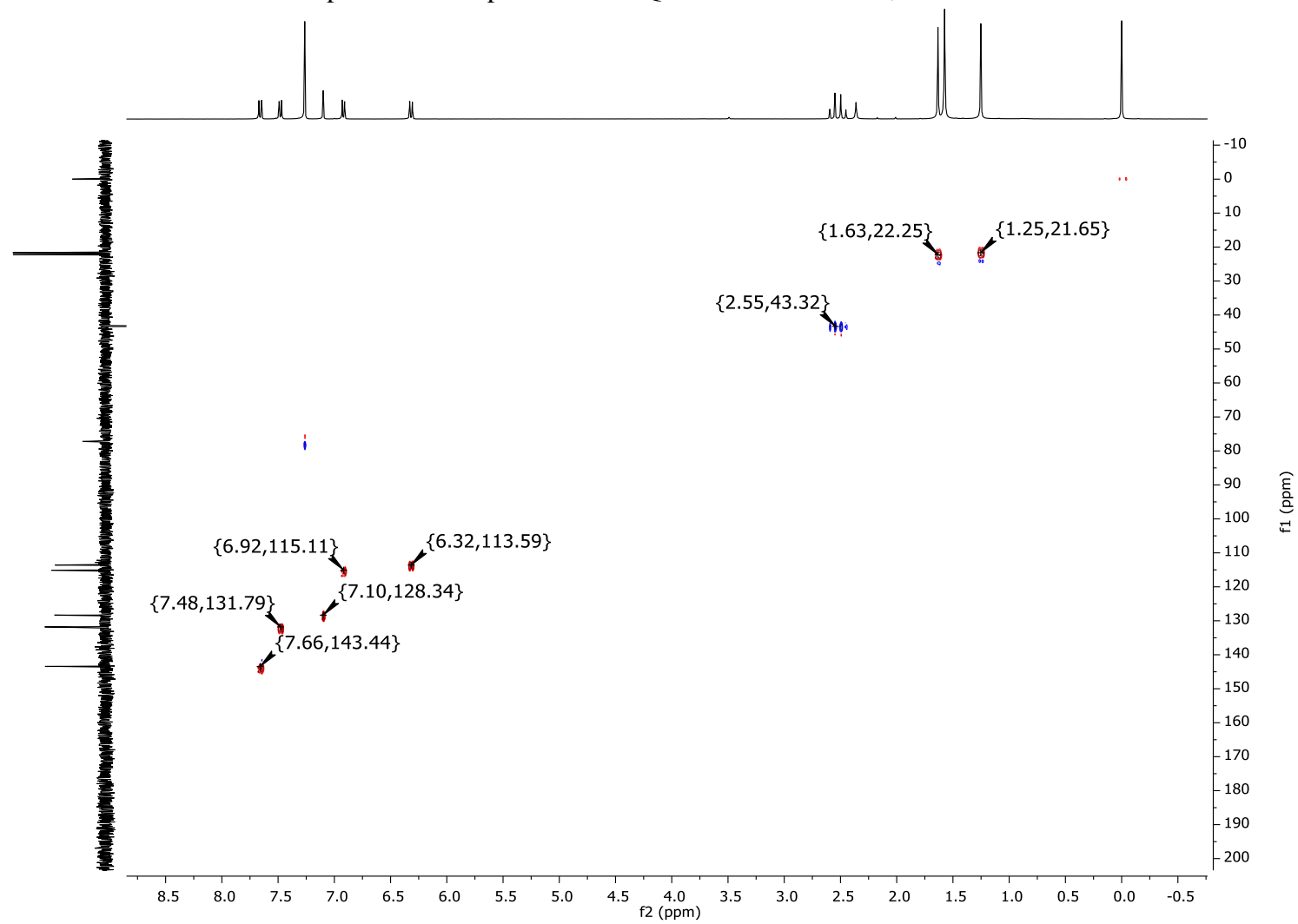
Apêndice E – Espectro de HMBC da FCPB₁₂C_{11a}, (CD₃)₂CO

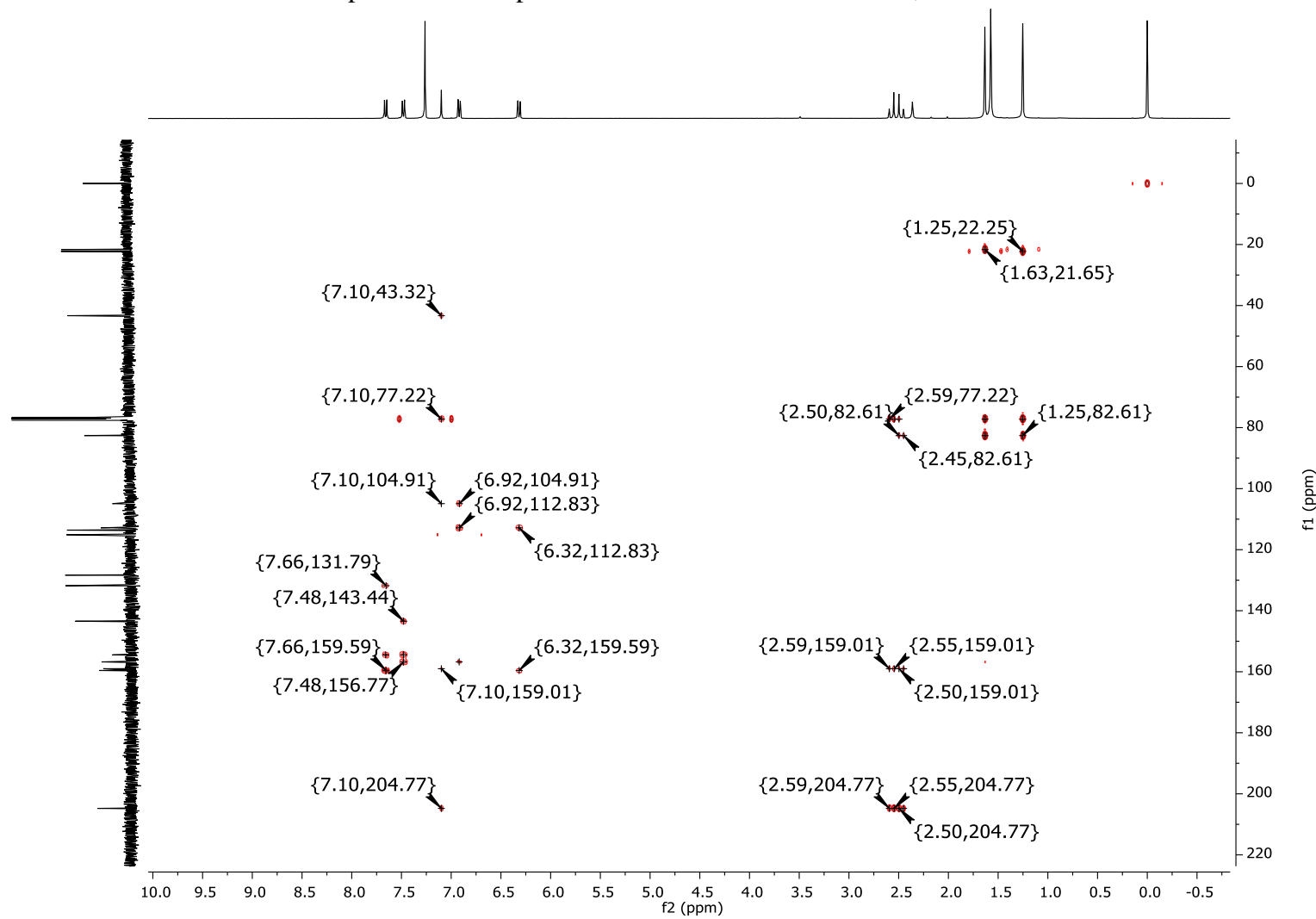


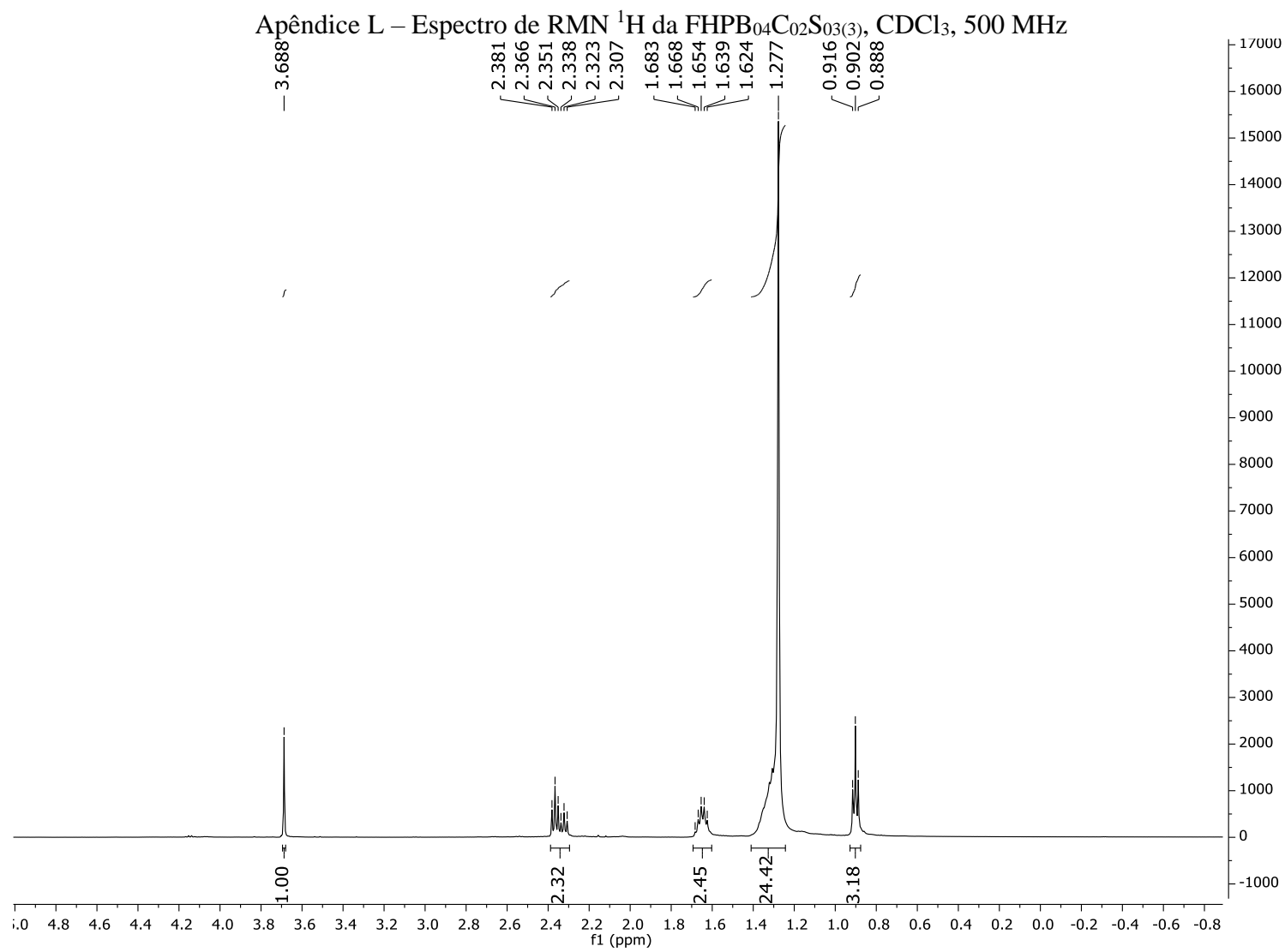


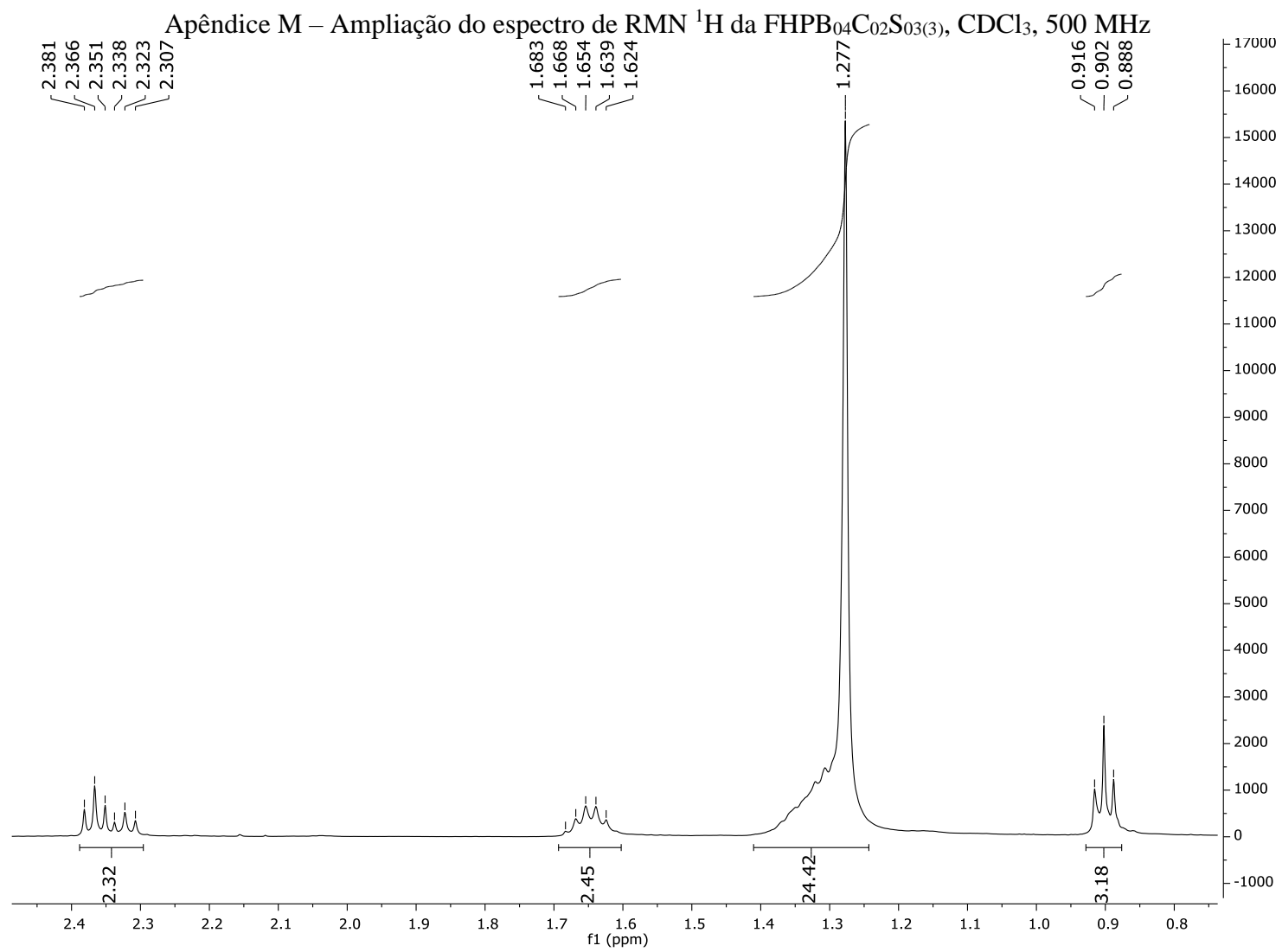
Apêndice H – Espectro de RMN ^{13}C da FCPB $_{12}\text{C}_{11}\text{C}_{05a}$, CDCl_3 , 125 MHz

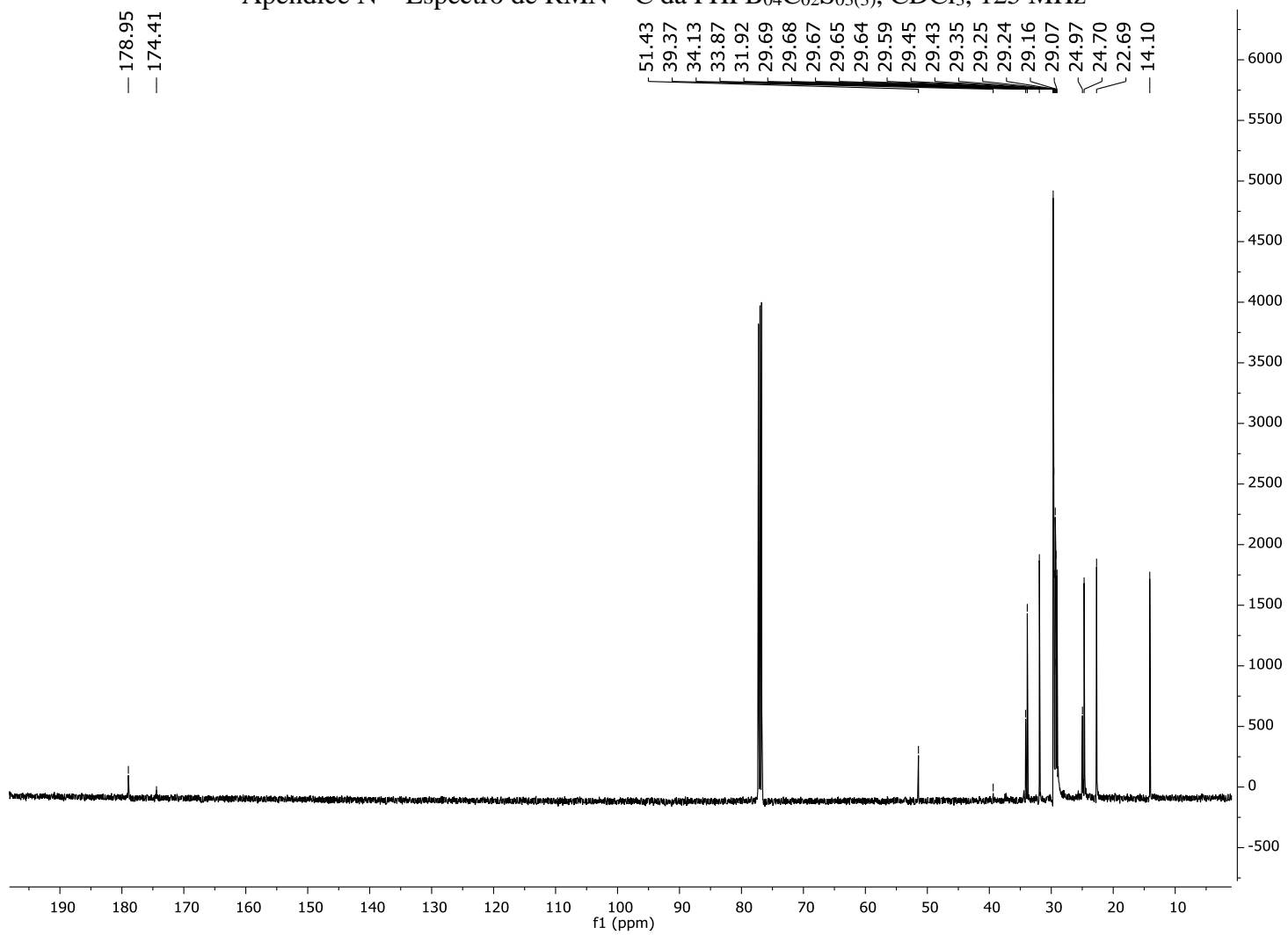


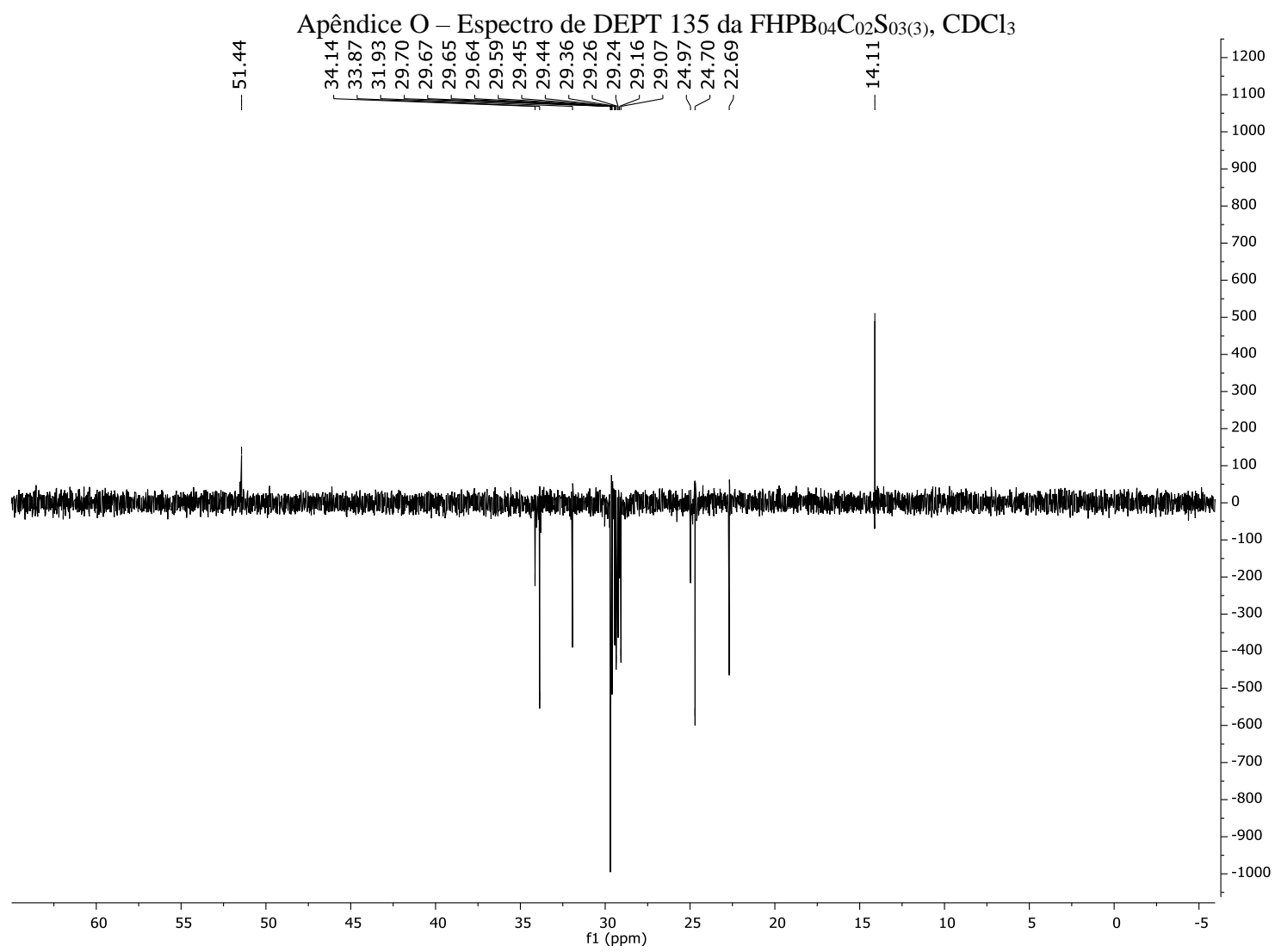
Apêndice J – Espectro de HMQC da FCPB₁₂C₁₁C_{05a}, CDCl₃

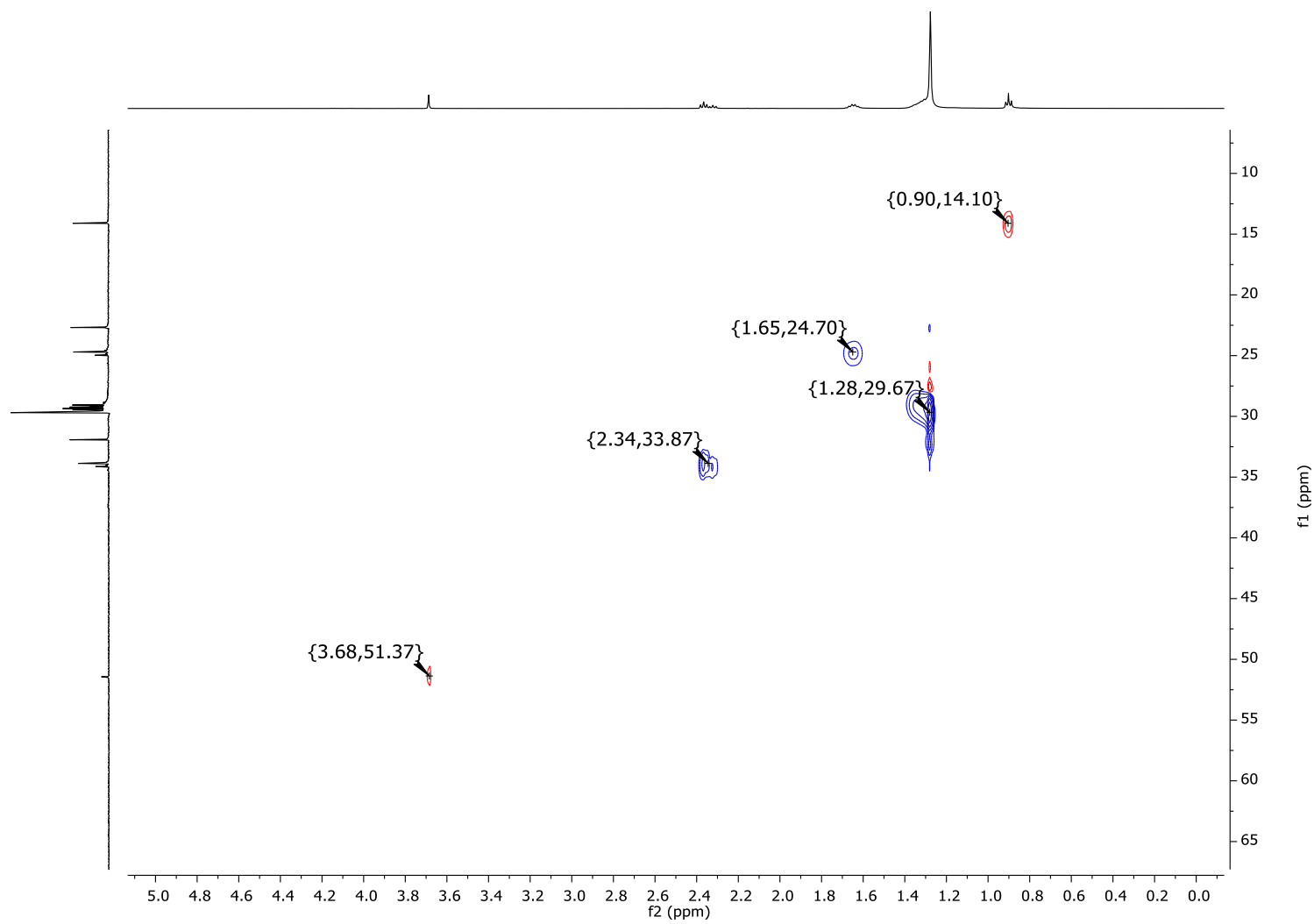
Apêndice K – Espectro de HMBC da FCPB₁₂C₁₁C_{05a}, CDCl₃

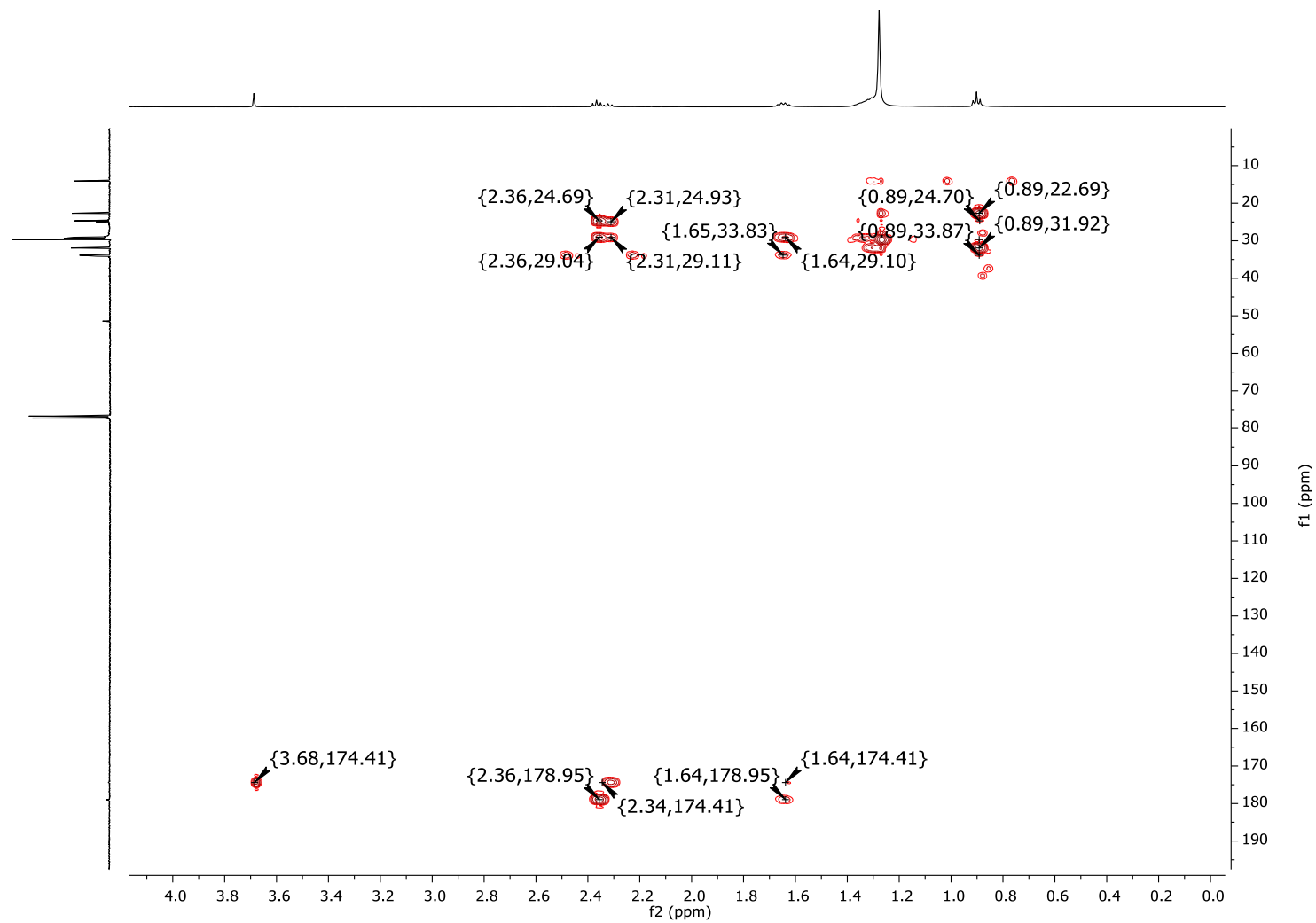


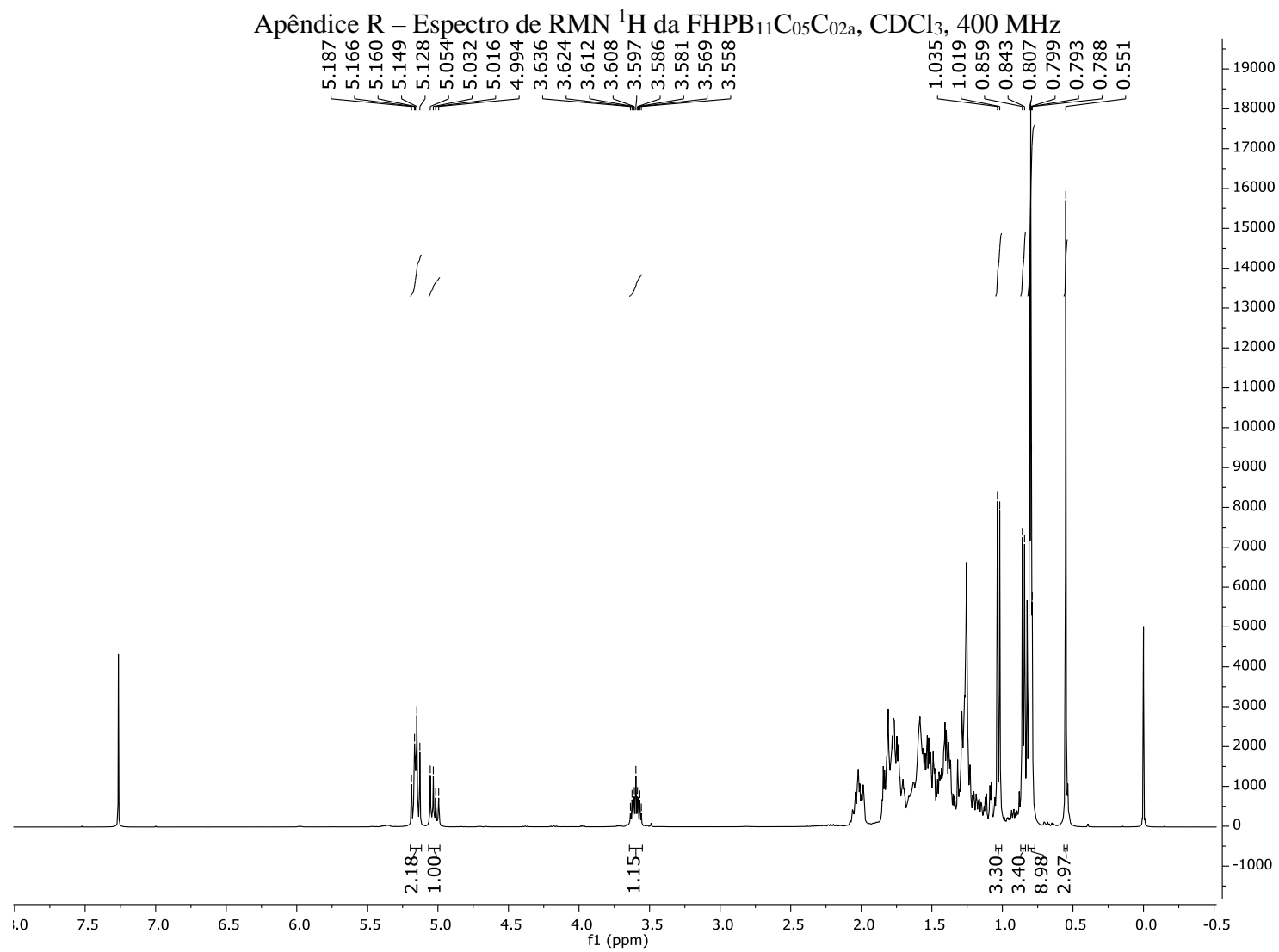


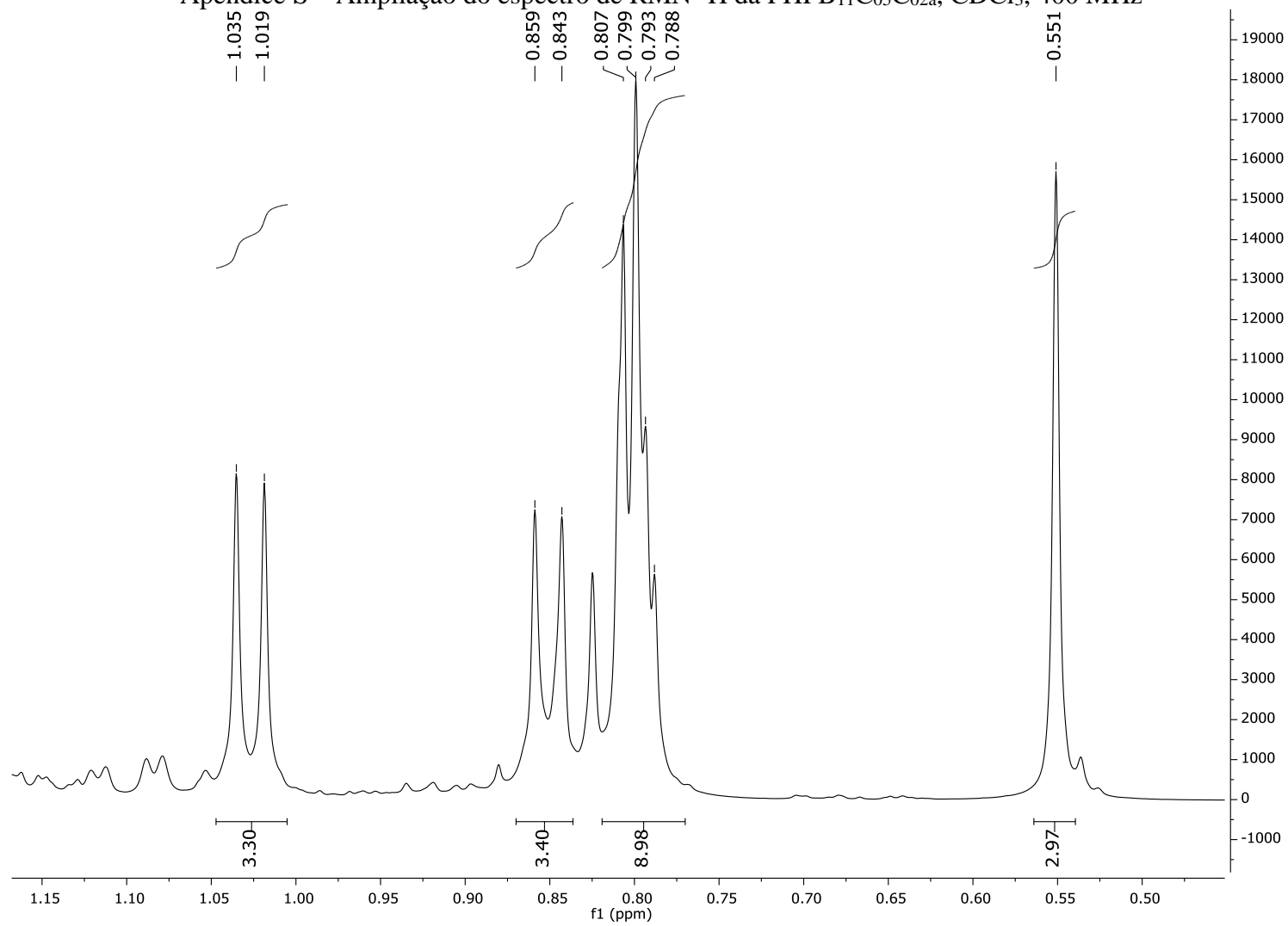
Apêndice N – Espectro de RMN ^{13}C da $\text{FHPB}_{04}\text{C}_{02}\text{S}_{03(3)}$, CDCl_3 , 125 MHz

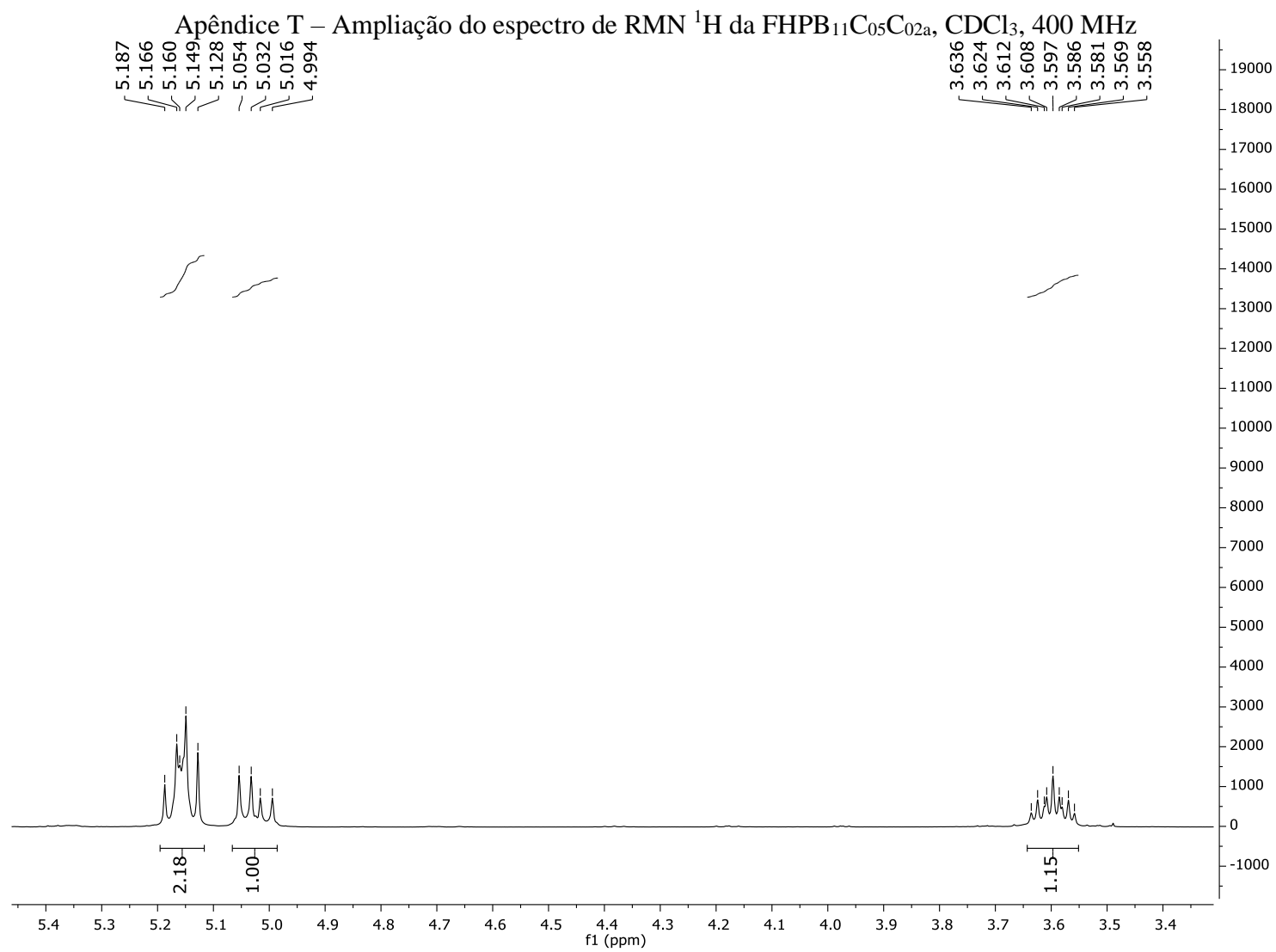


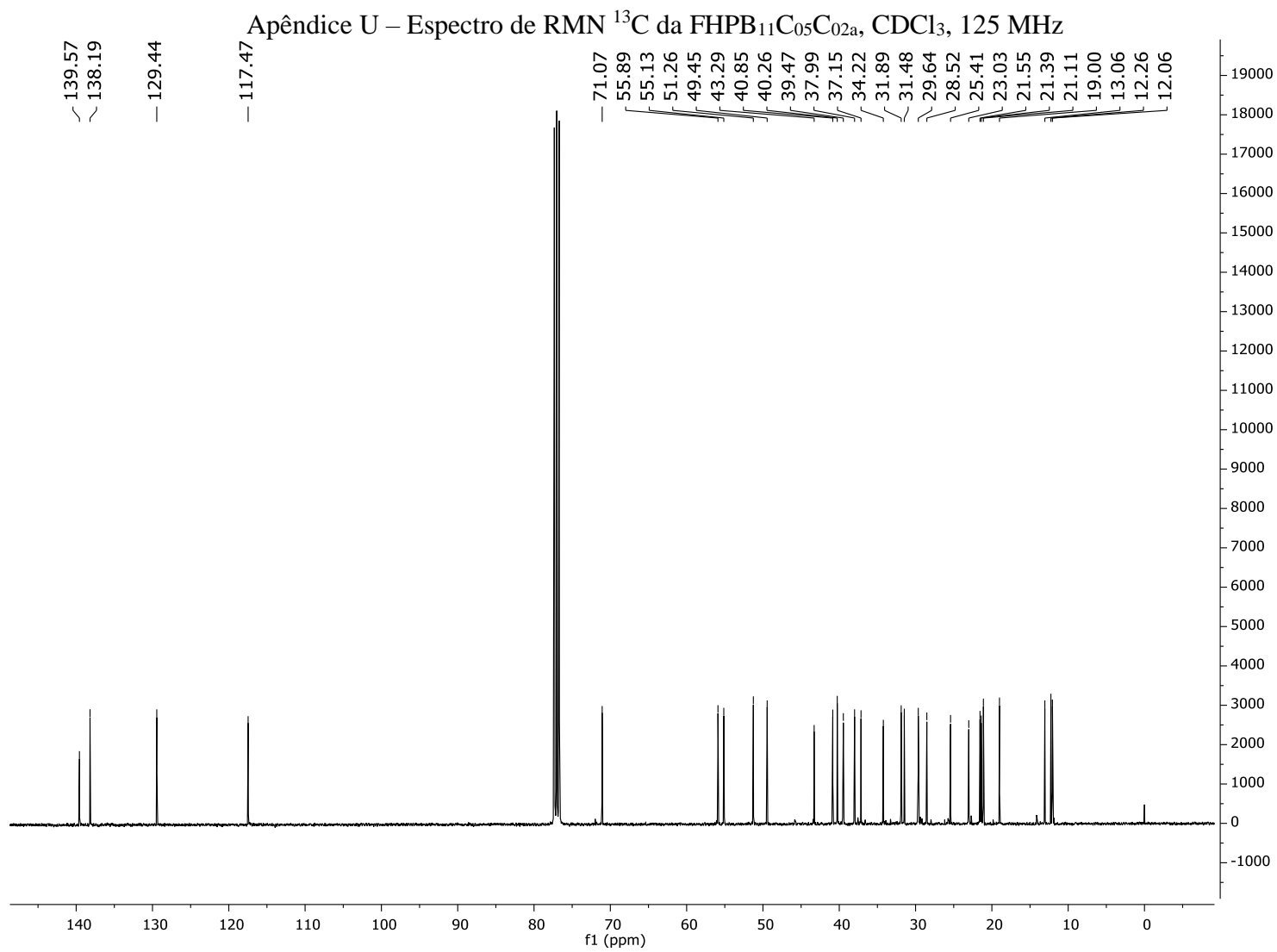
Apêndice P – Espectro de HMQC da FHPB₀₄C₀₂S₀₃₍₃₎, CDCl₃

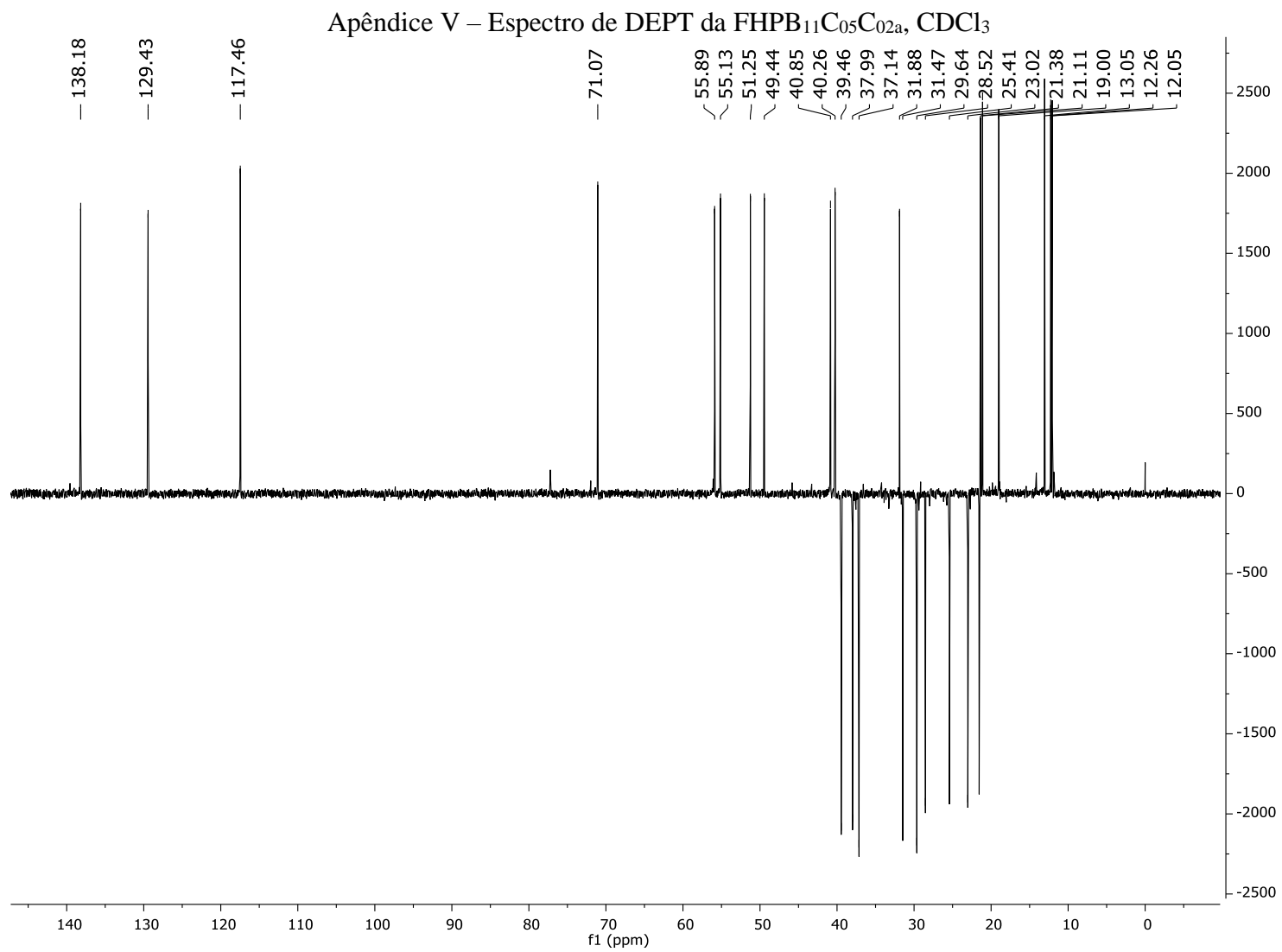
Apêndice Q – Espectro de HMBC da FHPB₀₄C₀₂S₀₃₍₃₎, CDCl₃



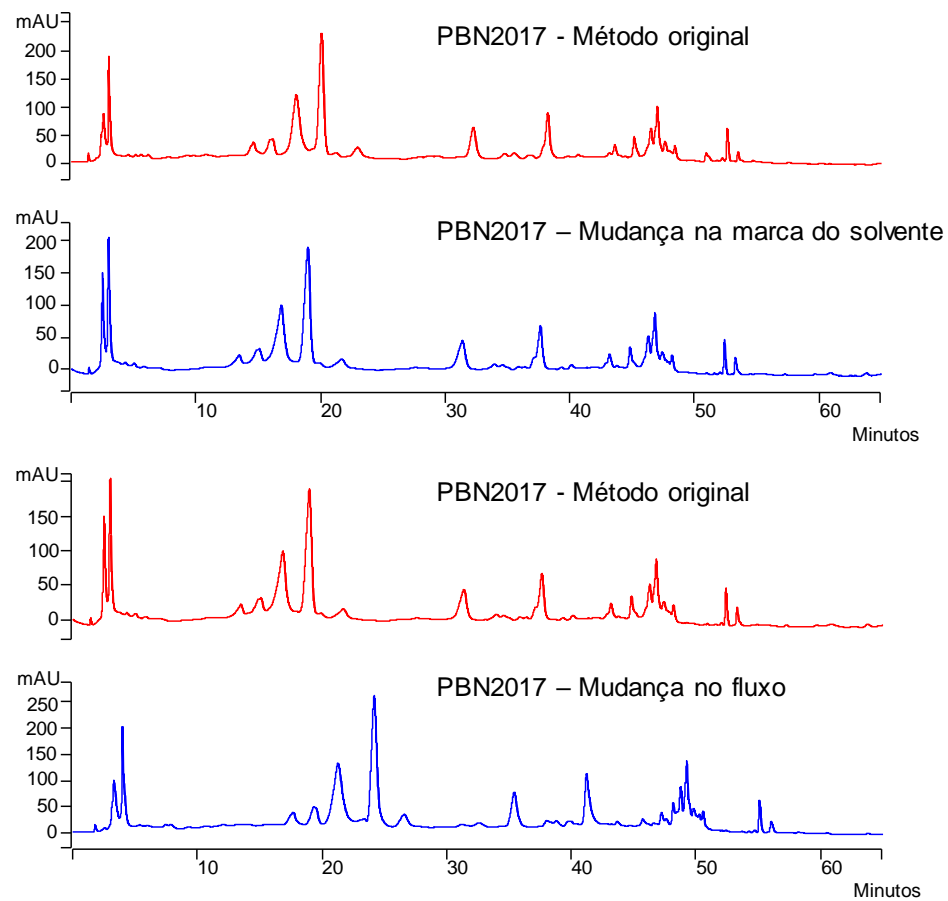
Apêndice S – Ampliação do espectro de RMN ^1H da FHPB $_{11}\text{C}_{05}\text{C}_{02a}$, CDCl_3 , 400 MHz







Apêndice W – Cromatogramas comparativos para análise da robustez



Mudança de solvente Metanol grau HPLC LiChrosolv® para PanReac AppliChem®
Mudança de fluxo de 0,8 mL/min para 0,6 mL/min