



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



**SYNTIA MENESES SILVA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
BIOLÓGICO DE *Senega pulchella* E *Senega trichosperma***

**SYNTIA MENESES SILVA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
BIOLÓGICO DE *Senega pulchella* E *Senega trichosperma***

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: Dr. Clayton Queiroz Alves (UEFS)

Coorientadores: Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar (UESB) e Prof. Dr. Hugo Neves Brandão (UEFS)

Feira de Santana – BA  
2025

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

S583e

Silva, Syntia Meneses

Estudo fitoquímico e avaliação do potencial biológico de *Senega pulchella* e *Senega trichosperma* / Syntia Meneses Silva. – 2025.

134 f.: il.

Orientador: Clayton Queiroz Alves

Coorientador(a): Rosane Moura Aguiar, Hugo Neves Brandão


Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Feira de Santana, 2025.

1.Botânica. 2.Fitoquímica. 3.Taxonomia. 4. Farmacologia. 5. Família Polygalaceae. 6. Espectrometria. I. Alves, Clayton Queiroz, orient.  
II. Aguiar, Rosane Moura, coorient. III. Brandão, Hugo Neves, coorient.  
IV. Universidade Estadual de Feira de Santana. V. Título.

CDU 582.755


Daniela Machado Sampaio Costa - Bibliotecária - CRB-5/2077

## BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente  
 **ANGELICA MARIA LUCCHESE**  
Data: 02/10/2025 10:26:10-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

Prof. Dra. Angélica Maria Lucchese  
Universidade Estadual de Feira de Santana - Presidente da Banca

Documento assinado digitalmente  
 **BRUNO OLIVEIRA MOREIRA**  
Data: 02/10/2025 23:19:08-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

Prof. Dr. Bruno Oliveira Moreira  
Universidade Federal da Bahia

Documento assinado digitalmente  
 **LUCIANO DA SILVA LIMA**  
Data: 04/10/2025 17:38:29-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

Prof. Dr. Luciano da Silva Lima  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia

Documento assinado digitalmente  
 **MANOELITO COELHO DOS SANTOS JUNIOR**  
Data: 08/10/2025 08:58:53-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Manoelito Coelho dos Santos Junior  
Universidade Estadual de Feira de Santana

Documento assinado digitalmente  
 **CLAYTON QUEIROZ ALVES**  
Data: 02/10/2025 10:10:04-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

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

Feira de Santana – BA  
2025

*À minha família pelo amor e companheirismo durante a realização deste trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me capacitado, me dado sabedoria, me abençoado e sustentado durante toda essa caminhada.

À minha família (Mãe - Nilzete, Pai - José, Irmãos - Rita, Amanda, Fabiano e Eliane, Sobrinha - Clarissa) e esposo (Cláudio), pelo apoio incondicional, por serem meu porto seguro, por serem os grandes incentivadores e melhores parceiros que eu poderia ter na vida.

*In memoriam* às pessoas que perdi durante esse processo e que torciam, acreditavam e me amavam genuinamente, Pai, Eliane (irmã) e Edigar (sogro), sempre amarei vocês!

Aos meus amigos, parceiros de vida, família que escolhi, que sempre me incentivaram, encorajaram e me ajudaram a renovar as minhas forças durante essa trajetória: Geizinha, Aline, Peixinho, Joanderson, Ró, Dani, Nadson, Ton, Sylvia, Tamilla, Marlus, Bruna, Bianka.

À Direção e colegas do Colégio da Polícia Militar Diva Portela, pelo apoio e incentivo.

Ao orientador, por ter acreditado que seria possível desde o primeiro encontro. Me apoiou durante toda trajetória, teve paciência com minha falta de tempo por conta da jornada de trabalho, paciência com minha inexperiência, ouviu meus desabafos, me mostrou luzes no fim túnel, sempre solícito e estendendo a mão, **MUITO OBRIGADA PELA CONFIANÇA, CLAYTON!**

À Rosane, por ter aberto as portas do Laboratório de Cromatografia da UESB, por ter me acolhido, por todo apoio.

Ao Professor Hugo, por toda colaboração e orientação, por ter incentivado e orientado as pesquisas realizadas no Laboratório de Bioprospecção Vegetal (LABIV - UEFS).

Aos Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações (UEFS), Grupo de Estudos de Atividade Biológica e Toxicológica de Compostos Naturais e Sintéticos (UFSC) e Laboratório de Produtos Naturais Bioativos da (UFPB).

Ao Professor José Floriano, pelo trabalho de identificação até envio do material vegetal, sempre muito paciente e solícito.

Aos parceiros de jornada, de bancada, que tornaram a trajetória mais leve, sempre muito solícitos: Adrienne, Douglas, Flávio, Rubens, Fabrício, Ícaro, Glauber, Laís, Rafael, Cleiton, Ana. Em especial aos que se tornaram amigos: Adrienne, Douglas e Flávio.

Às colegas do programa de RGV, Maria Aparecida, Sandra e Isabela, pelos momentos de estudos, pela partilha e trocas durante o curso.

A Fabrício, por ter me acolhido em Jequié, ter me ajudado nas análises das amostras em MPLC e por ter realizado outras análises importantes em HPLC.

À doutoranda Deyse, Gécica e ao Professor Franco Andrade que colaboraram com as análises *in vitro* e *in silico*.

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

A todos que colaboraram direta e indiretamente com a minha trajetória acadêmica,  
**MUITO OBRIGADA!**

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)*

## RESUMO

A utilização de plantas para fins terapêuticos constitui uma das práticas medicinais mais antigas da humanidade, e os recursos vegetais permanecem como fontes estratégicas de moléculas bioativas com potencial farmacológico. Este estudo teve como objetivo investigar o perfil fitoquímico e avaliar o potencial biológico de *Senega trichosperma* e *Senega pulchella* (Polygalaceae), coletadas respectivamente no campus da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), respectivamente. Após a secagem, as partes aéreas e raízes passaram por diferentes métodos de extração: Maceração em metanol (MM) e etanol (ME), Soxhlet (SOX) e Ultrassom (ULT). Os extratos resultantes da maceração em metanol foram subsequentemente submetidos a partição líquido-líquido, utilizando solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, clorofórmio e acetato de etila. As análises por CLAE-DAD revelaram perfis cromatográficos semelhantes entre os métodos, destacando a presença consistente de duas substâncias (ácido salicílico e 1,5-di-hidroxi-2,3-dimetoxixantona) em todas as amostras. Os rendimentos variaram de 10,8 a 27 %, sendo os maiores valores observados para a extração com metanol por Soxhlet. As frações obtidas a partir da partição foram submetidas a sucessivos processos cromatográficos (CC e MPLC), o que possibilitou o isolamento de metabólitos pertencentes às classes das xantonas e das cumarinas. Dentre as xantonas isoladas destacam-se a 1,5-di-hidroxi-6',6'-dimetilpirano [2',3':3,2] -xantona (6-desoxijacareubina) e a 1,5-di-hidroxi-2,3-dimetoxixantona. No grupo das cumarinas, foram identificadas a 2,2-dimetilpiranocumarina (Seselin) e a 8-(3-metil-2-butenil) benzopiran-2-ona (Osthol). A identificação estrutural foi confirmada por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (incluindo DEPT, HMQC e HMBC), IV e EM. Nos ensaios biológicos, os extratos brutos e frações exibiram conteúdos relevantes de fenólicos (até  $106,8 \pm 4,56 \text{ mg GAE} \cdot \text{g}^{-1}$ ) e flavonoides (até  $58,6 \pm 0,63 \text{ mg QE} \cdot \text{g}^{-1}$ ), associados a atividade antioxidante ( $\text{CE}_{50}$  de  $1,42 \pm 0,119 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  para DPPH;  $\text{CE}_{50}$  de  $0,200 \pm 0,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  para ABTS e  $\text{CI}_{50}$  de  $0,267 \pm 0,04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  para  $\beta$ -Caroteno). A avaliação antimicrobiana revelou ação frente a bactérias Gram-positivas e fungos leveduriformes, com CIM de  $1024 \mu\text{g/mL}$  para SPM, e CIM de  $512 \mu\text{g/mL}$  para as substâncias 6-desoxijacareubina e osthol. A atividade anticolinesterásica foi expressiva, com inibição de 56,78% de AChE para SPSOX e 48,65% para SPULT BuChE. Além disso, a 6-desoxijacareubina apresentou valores de  $\text{CI}_{50}$  de  $69,5 \mu\text{M}$  para AChE e  $47,3 \mu\text{M}$  para BuChE, enquanto o osthol exibiu  $\text{CI}_{50}$  de  $45,0 \mu\text{M}$  e  $298,5 \mu\text{M}$  para AChE e BuChE, respectivamente, resultados corroborados por análises de *docking* molecular *in silico* que evidenciaram interações estáveis com os sítios catalíticos das enzimas. Nos ensaios citotóxicos, SPSOX, SPM e SPULT apresentaram maior citotoxicidade frente à linhagem K562 ( $\text{CI}_{50} = 240,8, 271,4$  e  $251,4 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente), acompanhada de índices de seletividade superiores a 2 frente à linhagem de fibroblastos McCoy. Na atividade antileishmania, por sua vez, os compostos apresentaram inibição da enzima LbSODB2 de *Leishmania braziliensis*, e os deslocamentos observados em osthol e 6-desoxijacareubina indicam uma possível desestabilização da estrutura da proteína. Os resultados obtidos reforçam o potencial de *S. trichosperma* e *S. pulchella* como fontes de metabólitos bioativos promissores, com múltiplas propriedades farmacológicas e relevância para estudos de quimiotaxonomia, contribuindo para o aproveitamento racional e sustentável da biodiversidade brasileira.

**Palavras-chave:** *Senega*. Fitoquímica. CLAE-DAD. Espectrometria. Ensaios *in vitro* e *in silico*.

## ABSTRACT

The use of plants for therapeutic purposes is one of the oldest medicinal practices known to humanity, and vegetal resources remain strategic sources of bioactive molecules with pharmacological potential. This study aimed to investigate the phytochemical profile and evaluate the biological potential of *Senega trichosperma* and *Senega pulchella* (Polygalaceae), collected on the campuses of the Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) and the Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), respectively. After drying, the aerial parts and roots were subjected to different extraction methods: methanolic maceration (MM), ethanolic maceration (ME), Soxhlet extraction (SOX), and ultrasound-assisted extraction (ULT). The methanolic maceration extracts were further partitioned using a liquid–liquid fractionation system with solvents of increasing polarity: hexane, chloroform, and ethyl acetate. HPLC-DAD analyses revealed similar chromatographic profiles among the extraction methods, highlighting the consistent presence of two compounds (salicylic acid and 1,5-dihydroxy-2,3-dimethoxyxanthone) across all samples. Extraction yields ranged from 10.8% to 27%, with the highest values observed for Soxhlet methanolic extraction. The fractions obtained from partitioning were submitted to successive chromatographic processes (CC and MPLC), which enabled the isolation of metabolites belonging to the xanthone and coumarin classes. Among the isolated xanthenes, 1,5-dihydroxy-6',6'-dimethylpyrano [2',3':3,2] -xanthone (6-desoxijacareubin) and 1,5-dihydroxy-2,3-dimethoxyxanthone were identified. Within the coumarins, 2,2-dimethylpyranocoumarin (Seselin) and 8-(3-methyl-2-butenyl) benzopyran-2-one (Osthol) were isolated. Structural characterization was confirmed by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (including DEPT, HMQC, and HMBC), IR, and MS analyses. In the biological assays, crude extracts and fractions exhibited relevant levels of phenolics (up to 106.8 ± 4.56 mg GAE·g<sup>-1</sup>) and flavonoids (up to 58.6 ± 0.63 mg QE·g<sup>-1</sup>), associated with antioxidant activity (IC<sub>50</sub> of 1.42 ± 0.119 mg·mL<sup>-1</sup> for DPPH; IC<sub>50</sub> of 0.200 ± 0.0 mg·mL<sup>-1</sup> for ABTS; and IC<sub>50</sub> of 0.267 ± 0.04 mg·mL<sup>-1</sup> for the β-carotene assay). Antimicrobial evaluation demonstrated activity against Gram-positive bacteria and yeast-like fungi, with MIC values of 1024 µg/mL for SPMM and 512 µg/mL for 6-desoxijacareubin and Osthol. Anticholinesterase activity was prominent, with 56.78% AChE inhibition for SPSOX and 48.65% BuChE inhibition for SPULT. Additionally, 6-desoxijacareubin yielded IC<sub>50</sub> values of 69.5 µM for AChE and 47.3 µM for BuChE, while Osthol exhibited IC<sub>50</sub> values of 45.0 µM and 298.5 µM for AChE and BuChE, respectively, results corroborated by *in silico* molecular docking analyses that revealed stable interactions with the catalytic sites of the enzymes. In cytotoxicity assays, SPSOX, SPMM, and SPULT showed higher activity against the K562 cell line (IC<sub>50</sub> = 240.8, 271.4, and 251.4 µg/mL, respectively), with selectivity indices greater than 2 compared to McCoy fibroblasts. Regarding anti-leishmanial activity, the isolated compounds inhibited the LbSODB2 enzyme from *Leishmania braziliensis*, and the thermal shift responses observed for Osthol and 6-desoxijacareubin suggested potential destabilization of the protein structure. Overall, the results highlight *S. trichosperma* and *S. pulchella* as promising sources of bioactive metabolites with multiple pharmacological properties and chemotaxonomic relevance, contributing to the rational and sustainable use of Brazilian biodiversity.

**Keywords:** *Senega*. Phytochemistry. HPLC-DAD. Spectrometry. *In vitro* and *in silico* assays.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição do número de espécies de <i>Senega</i> por região geográfica do Brasil	25
<b>Figura 2.</b> Principais classes de metabólitos secundários isolados de espécies do gênero <i>Senega</i> (Polygalaceae). (1) saponina triterpênica; (2) esteróide; (3) oligossacarídeo esterificado; (4) salicilato de metila; (5) xantona; (6) flavonoide; (7) esterilpirona e (8) dihidroesterilpirona; (9) e (10) cumarina.	27
<b>Figura 3.</b> Estrutura química que configura o núcleo de uma xantona	28
<b>Figura 4.</b> (A) <i>Senega trichosperma</i> ; (B) <i>Senega pulchella</i>	31
<b>Figura 5.</b> <i>Senega pulchella</i> : a) recebido após a coleta b) após o processo de secagem em estufa c) triturado	32
<b>Figura 6.</b> Extração por maceração	33
<b>Figura 7.</b> Extração por ultrassom	33
<b>Figura 8.</b> Extração por soxhlet	34
<b>Figura 9.</b> Partição do extrato bruto com hexano	35
<b>Figura 10.</b> Partição do extrato bruto com clorofórmio	35
<b>Figura 11.</b> Partição do extrato bruto com acetato de etila	36
<b>Figura 12.</b> Curvas analíticas obtidas para a quantificação de fenólicos totais e flavonoides. (A) Curva padrão de ácido gálico (765 nm) para determinação de fenólicos totais. (B) Curva padrão de quercetina (430 nm) para determinação de flavonoides totais	45
<b>Figura 13.</b> Curva padrão de ácido ascórbico utilizada no ensaio FRAP para determinação da capacidade antioxidante, expressa em mg de ácido ascórbico equivalente por grama de amostra.	49
<b>Figura 14.</b> Sistema de realização do teste de letalidade da <i>Artemia salina</i>	50
<b>Figura 15.</b> Cromatograma dos padrões identificados nas amostras de extratos brutos de <i>S. pulchella</i> , obtidos a partir da extração por Maceração Metanólica (SPMM), Maceração Etanólica (SPME), Soxhlet (SPSOX) e Ultrassom (SPULT)	59
<b>Figura 16.</b> Cromatograma do mix padrões testados na concentração de 300 µg/mL	60
<b>Figura 17.</b> Perfis cromatográficos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD, $\lambda = 280$ nm) dos extratos brutos de <i>Senega trichosperma</i> (ST) e <i>Senega pulchella</i> obtidos por diferentes métodos de extração: SPMM, SPME, SPSOX e SPULT	63
<b>Figura 18.</b> Curvas de calibração obtidas por HPLC-DAD. (A) Ácido cafeico. (B) Ácido salicílico	67

<b>Figura 19.</b> Curvas de calibração obtidas por HPLC-DAD. (C) Rutina. (D) Substância 4	67
<b>Figura 20.</b> Proposta estrutural para a Substância 1, baseada na análise dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$	71
<b>Figura 21.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da Substância 1.	71
<b>Figura 22.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da Substância 1, com destaque para a integração dos sinais	72
<b>Figura 23.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância da Substância 1.	72
<b>Figura 24.</b> Proposta estrutural para a Substância 2, baseada na análise dos espectros de IV e RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$	75
<b>Figura 25.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, DMSO) da Substância 2	75
<b>Figura 26.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, DMSO) da Substância 2	76
<b>Figura 27.</b> Espectro no infravermelho (IV) da Substância 2	76
<b>Figura 28.</b> Proposta estrutural para a Substância 3, baseada na análise dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$	78
<b>Figura 29.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da Substância 3	79
<b>Figura 30.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da Substância 3, com destaque para a integração dos sinais	79
<b>Figura 31.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da Substância 3	80
<b>Figura 32.</b> Espectro no infravermelho (IV) da Substância 4	81
<b>Figura 33.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da Substância 4	82
<b>Figura 34.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da Substância 4	82
<b>Figura 35.</b> Espectro de HMQC (500/125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da Substância 4	83
<b>Figura 36.</b> Espectro de HMBC (500/125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da Substância 4	84
<b>Figura 37.</b> Correlações heteronucleares observadas no espectro de RMN bidimensional HMBC da Substância 4	84
<b>Figura 38.</b> Fragmentação de ESI-MS/MS da Substância 4	85
<b>Figura 39.</b> Proposta estrutural para a Substância 4, baseada na análise dos espectros de EM, IV e RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$	86
<b>Figura 40.</b> Correlação de Pearson entre Conteúdos de fenólicos e flavonoides totais, ensaios antioxidantes e letalidade frente à <i>Artemia salina</i> do extrato bruto e frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila das espécies <i>S. pulchella</i> e <i>S. trichosperma</i>	91
<b>Figura 41.</b> Porcentagem de viabilidade celular das linhagens K562 (leucemia), PC3 (próstata), McCoy (fibroblasto murino) e HUVEC (células endoteliais humanas) após 48 h de tratamento com diferentes frações (MM, SOX, ME e ULT).	102

<b>Figura 42.</b> Curvas de concentração inibitória (CI <sub>50</sub> ) da Substância <b>2</b> frente às enzimas colinesterases (AChE) e (BuChE)	106
<b>Figura 43.</b> Estrutura química dos compostos mencionados: a – Osthol, b – Aurapteno, c – Poligaleno e d - 2H-1-benzopiran-2-ona-5,7-dimetoxi	107
<b>Figura 44.</b> Curvas dose–resposta da Substância <b>3</b> frente às enzimas colinesterases. (A) Inibição da acetilcolinesterase (AChE). (B) Inibição da butirilcolinesterase (BuChE)	108
<b>Figura 45.</b> Mapas 2D das interações intermoleculares de ligantes cristalográficos (di-hidrotanshinona I (A) para AChE e tacrina (C) para BuChE e a Substância <b>2</b> frente AChE (B) e BuChE (D)	110
<b>Figura 46.</b> Representação do <i>docking</i> molecular da Substância <b>3</b> nos sítios de ligação da AChE (A) e BuChE (B)	111
<b>Figura 47.</b> Gráfico do ensaio concentração–resposta das Substâncias 2, 3 e 4 frente a LbSODB2	113
<b>Figura 48.</b> Espectros em modo negativo para $m/z$ 287 [M–H] <sup>–</sup> da Substância <b>4</b>	129
<b>Figura 49.</b> Espectros em modo negativo para $m/z$ 287 [M–H] <sup>–</sup> da Substância <b>4</b>	129
<b>Figura 50.</b> Espectros em modo positivo para $m/z$ 289 [M+H] <sup>+</sup> da Substância <b>4</b>	130
<b>Figura 51.</b> Espectros em modo positivo para $m/z$ 289 [M+H] da Substância <b>4</b>	130
<b>Figura 52.</b> Espectro de infravermelho da Substância <b>4</b> isolada na fração acetato de etila	131
<b>Figura 53.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Substância <b>4</b> isolada na fração acetato de etila	131
<b>Figura 54.</b> Expansão (6,0 – 8,0 ppm) do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Substância <b>4</b> isolada na fração acetato de etila	132
<b>Figura 55.</b> Expansão (2,0 – 4,0 ppm) do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Substância <b>4</b> isolada na fração acetato de etila	132
<b>Figura 56.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Substância <b>4</b> isolada na fração acetato de etila	133
<b>Figura 57.</b> Expansão (100- 130 ppm) do espectro de RMN de <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Substância <b>4</b> isolada na fração acetato de etila	133
<b>Figura 58.</b> Espectro de DEPT da Substância <b>4</b> isolada na fração acetato de etila	134
<b>Figura 59.</b> Espectro de HMQC (500/125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Substância <b>4</b> isolada na fração acetato de etila	134
<b>Figura 60.</b> Espectro de HMBC (500/125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Substância <b>4</b> isolada na fração acetato de etila	135

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais atividades biológicas atribuídas a algumas espécies do gênero <i>Senega</i>	29
<b>Tabela 2.</b> Subfrações obtidas da STFH, com suas respectivas massas e fase móvel utilizada na extração	37
<b>Tabela 3.</b> Agrupamentos obtidos da CC da STFH-A	37
<b>Tabela 4.</b> Subfrações obtidas da STFH-B, que levaram ao isolamento do composto purificado STFH-B5.2 e suas respectivas massas	38
<b>Tabela 5.</b> Subfrações obtidas da STFC, que levaram ao isolamento do composto purificado STFC-C2, e suas respectivas massas	40
<b>Tabela 6.</b> Rendimento dos extratos brutos obtidos através de diferentes métodos de extração de <i>S. pulchella</i>	57
<b>Tabela 7.</b> Rendimento do extrato bruto e partições obtidos de <i>S. trichosperma</i> , <i>S. pulchella</i>	58
<b>Tabela 8.</b> Áreas dos picos e concentrações correspondentes ao ácido salicílico e a Substância 4, identificados por CLAE-DAD nos extratos brutos de <i>Senega pulchella</i>	60
<b>Tabela 9.</b> Dados da curva analítica do ácido cafeico obtidos por HPLC-DAD	64
<b>Tabela 10.</b> Dados da curva analítica do ácido salicílico obtidos por HPLC-DAD	64
<b>Tabela 11.</b> Dados da curva analítica da rutina obtidos por HPLC-DAD	64
<b>Tabela 12.</b> Dados da curva analítica da Substância 4 obtidos por HPLC-DAD	65
<b>Tabela 13.</b> Análise de variância aplicada às curvas analíticas dos analitos	66
<b>Tabela 14.</b> Valor médio do coeficiente Linear, angular e do F's para determinação da linearidade	68
<b>Tabela 15.</b> Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) determinados para os analitos	69
<b>Tabela 16.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ apresentados pela Substância 1 [500 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), $\text{CDCl}_3$ , $\delta(\text{ppm})$ , J (Hz)]	70
<b>Tabela 17.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ apresentados pela Substância 2 [500 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), $\text{CDCl}_3$ , $\delta(\text{ppm})$ , J (Hz)]	74
<b>Tabela 18.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ apresentados pela Substância 3 [500 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), $\text{CDCl}_3$ , $\delta(\text{ppm})$ , J (Hz)]	78
<b>Tabela 19.</b> Sinais de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ e correlações bidimensionais (HMBC) da Substância 4 isolada das frações clorofórmica e acetato de etila, em comparação com dados da literatura	87

<b>Tabela 20.</b> Teores de fenólicos e flavonoides totais, ensaios antioxidantes do extrato bruto e frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila das espécies <i>S. pulchella</i> e <i>S. trichosperma</i>	89
<b>Tabela 21.</b> Conteúdos de fenólicos e flavonoides totais, ensaios antioxidantes dos extratos brutos de <i>S. pulchella</i>	93
<b>Tabela 22.</b> Letalidade frente a <i>Artemia salina</i> , expressa em CL <sub>50</sub> (mg.mL <sup>-1</sup> ) para extratos e frações de <i>S. pulchella</i> e <i>S. trichosperma</i>	95
<b>Tabela 23.</b> Resultados da avaliação da CIM, CBM e CFM (µg/mL) das amostras de <i>S. trichosperma</i> e <i>S. pulchella</i> contra espécies microbianas-Técnica de Microdiluição	97
<b>Tabela 24.</b> Resultados da média da avaliação (n=3) da Concentração Inibitória Mínima/CIM (µg/mL) das Substâncias 2, 3 e 4 contra espécies microbianas-Técnica de Microdiluição	99
<b>Tabela 25.</b> Valores de CI <sub>50</sub> encontrados para as linhagens celulares testadas nos tratamentos com extratos brutos de <i>Senega pulchella</i> obtidos pelos métodos de extração: i) Maceração Metanólica (SPMM); ii) Maceração Etanólica (SPME); iii) Soxhlet (SPSOX); iv) Ultrassom (SPULT)	100
<b>Tabela 26.</b> Seletividade da citotoxicidade dos extratos brutos de <i>Senega pulchella</i> para células tumorais (K562 e PC3), em comparação com células não tumorais (HUVEC e McCoy)	101
<b>Tabela 27.</b> Inibição de AChE e BuChE pelos extratos brutos de <i>S. pulchella</i>	104

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS<sup>+</sup> – Radical 2,2',6,6'-tetraamino-3,5-dimetilbenzotiazolína-6-sulfônico)

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

AlCl<sub>3</sub> – Cloreto de Alumínio

BuChE – Butirilcolinesterase

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CE<sub>50</sub> – Concentração Efetiva

CH<sub>3</sub>COONa – Acetato de Sódio

CI<sub>50</sub> – Concentração Inibitória

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CL<sub>50</sub> – Concentração Letal

DAD – Diode Array Detector

*d* – dubleto

*dd* – duplo dubleto

DEPT – Distortionless Enhanced Polarization Transfer

DPPH – Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EB – Extrato Bruto

FA – Fração Acetato de Etila

FC – Fração Clorofórmica

FH – Fração Hexânica

FT – Fenólicos Totais

His – Histidina

HPLC (CLAE) – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Hz – Hertz

*J* – Constante de Acoplamento

LAS – Letalidade frente à *Artemia salina*

LD – Limite de Detecção

*m* – múltiplo

MH – Müller Hinton

MPLC – Medium pressure liquid chromatography

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – Carbonato de Sódio

nm – Nanômetro

ppm – parte por milhão

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

*s* – singleto

Ser – Serina

SP – *Senega pulchella*

ST – *Senega trichosperma*

*t* – tripleto

Trp – Triptofano

Tyr – Tirosina

UV – Ultravioleta

μg – Micrograma

μg /mL – Micrograma por mililitro

μL – Microlitro

mMol – Milimol

δ – Deslocamento Químico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>21</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1 Família Polygalaceae</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2 Gênero <i>Senega</i></b> .....	<b>24</b>
<b>2.3 Classe de Metabólitos Comuns em <i>Senega</i> spp</b> .....	<b>26</b>
<b>2.4 Atividades Biológicas Características do Gênero</b> .....	<b>28</b>
<b>3.METODOLOGIA</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1 Materiais e equipamentos</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2 Material vegetal</b> .....	<b>31</b>
<b>3.3 Preparação de extratos e frações</b> .....	<b>32</b>
<b>3.4 Isolamento dos constituintes de <i>Senega trichosperma</i></b> .....	<b>36</b>
<b>3.4.1 Fração Hexânica (STFH)</b> .....	<b>36</b>
3.4.1.1 STFH-A3 - Substância 1 .....	37
3.4.1.2 STFH-B5 – Substância 2 .....	38
<b>3.4.2 Fração Clorofórmica (STFC)</b> .....	<b>38</b>
3.4.2.1 STFC-C2 – Substância 3 .....	39
<b>3.5 Isolamento dos constituintes de <i>Senega pulchella</i></b> .....	<b>40</b>
<b>3.5.1 Fração Clorofórmica (SPFC)</b> .....	<b>40</b>
3.5.1.1 SPFC-C – Substância 4 .....	41
<b>3.5.2 Fração Acetato de Etila (SPFAC)</b> .....	<b>41</b>
3.5.2.1 SPFAC-C Substância 5.....	41
<b>3.6 Análise do perfil químico por CLAE-DAD</b> .....	<b>41</b>
<b>3.6.1 Preparação das amostras</b> .....	<b>42</b>
<b>3.6.2 Condições da CLAE-DAD</b> .....	<b>42</b>
<b>3.6.3 Análise das amostras</b> .....	<b>42</b>
<b>3.6.4 Quantificação</b> .....	<b>43</b>
3.6.4.1 Curva Analítica.....	43
3.6.4.2 Limite de detecção e de quantificação.....	43
<b>3.7 Estudo de propriedades biológicas</b> .....	<b>44</b>
3.7.1 Amostras avaliadas nos ensaios biológicos .....	44
3.7.2 Determinação do conteúdo de Fenólicos e Flavonoides totais.....	44

3.7.3	Avaliação da Atividade Antioxidante.....	46
3.7.3.1	Determinação da ação sequestradora do radical livre DPPH .....	46
3.7.3.2	Determinação da atividade antioxidante pelo sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico 47	
3.7.3.3	Determinação da atividade antioxidante através do método ABTS .....	48
3.7.3.4	Determinação do poder antioxidante por meio da redução do Ferro (FRAP).....	48
3.7.4	Ensaio biológico .....	49
3.7.4.1	Avaliação de letalidade frente a <i>Artemia salina</i> .....	49
3.7.4.2	Avaliação da Atividade Antimicrobiana .....	51
3.7.4.3	Avaliação da Atividade Anticolinesterásica ( <i>in vitro</i> e <i>in sílico</i> ).....	53
3.7.4.4	Avaliação da Atividade Citotóxica.....	55
3.7.4.5	Avaliação da Atividade <i>Antileishmania</i> .....	56
3.7.5	Análise estatística .....	56
<b>4.RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>		<b>57</b>
<b>4.1 Obtenção de extratos e frações .....</b>		<b>57</b>
<b>4.2 Análise do perfil químico por CLAE-DAD .....</b>		<b>59</b>
<b>4.2.1 Quantificação .....</b>		<b>63</b>
4.2.1.1	Curva analítica.....	63
4.2.1.2	Limite de detecção e de quantificação.....	68
<b>4.3 Isolamento de metabólitos secundários a partir das frações particionadas de <i>S. trichosperma</i> .....</b>		<b>69</b>
<b>4.3.1 Substância 1 - 2,2-dimetilpiranocumarina .....</b>		<b>69</b>
<b>4.3.2 Substância 2 - 1,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':3,2) - xantona .....</b>		<b>72</b>
<b>4.3.3 Substância 3 - (8-(3-metil-2-butenil) - benzopiran-2-ona) .....</b>		<b>77</b>
<b>4.4 Isolamento de metabólitos secundários a partir das frações particionadas de <i>S. pulchella</i> .....</b>		<b>80</b>
<b>4.4.1 Substância 4 - (1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona) .....</b>		<b>80</b>
<b>4.5 Determinações de teores de fenólicos e flavonoides totais e ensaios antioxidantes ....</b>		<b>89</b>
<b>4.5.1 Extratos brutos e partições de <i>S. trichosperma</i> e <i>S. pulchella</i>.....</b>		<b>89</b>
<b>4.5.1.1 Correlação entre teores de fenólicos e flavonoides totais e atividade antioxidante</b>		
<b>91</b>		
<b>4.5.2 Extratos brutos de <i>S. pulchella</i> .....</b>		<b>92</b>
<b>4.6 Ensaio biológico gerais .....</b>		<b>94</b>
4.6.1	Letalidade frente à <i>Artemia salina</i> .....	94
4.6.2	Atividade antimicrobiana .....	96

4.6.2.1 Atividade antimicrobiana de extratos e frações de <i>S. pulchella</i> e <i>S. trichosperma</i> e de extratos de <i>S. pulchella</i> obtidos por diferentes métodos e solventes de extração .....	96
4.6.2.2 Atividade antimicrobiana das Substâncias <b>2, 3 e 4</b> .....	98
4.6.3 Atividade citotóxica.....	100
4.6.4. Atividade Anticolinesterásica <i>in vitro</i> .....	103
4.6.4.1 Extratos brutos de <i>S. pulchella</i> .....	103
4.6.4.2 Substâncias <b>2 e 3</b> .....	106
4.6.5 Atividade Anticolinesterásica <i>in silico</i> .....	108
4.6.6 Atividade Antileishmania .....	112
<b>5.CONCLUSÃO.....</b>	<b>114</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>116</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>129</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O uso de plantas como recurso terapêutico remonta às civilizações mais antigas, nas quais os vegetais eram utilizados não apenas como fonte de alimento, abrigo e combustível, mas também como medicamentos. A utilização medicinal, entretanto, apresentou ao longo da história tanto sucessos quanto insucessos, pois, em muitos casos, as mesmas espécies que curavam também podiam causar intoxicações e efeitos adversos graves, decorrentes do desconhecimento sobre suas propriedades químicas e farmacológicas (Tomazzoni; Negrelle; Centa, 2006; Anywar et al., 2021).

Nas últimas décadas, a relevância do estudo de plantas para fins medicinais tem se ampliado, tanto pelo seu uso tradicional em práticas terapêuticas quanto pelo seu papel como fontes de novas moléculas bioativas para o desenvolvimento de fármacos inovadores. Revisões abrangentes de Newman e Cragg (2020) mostram que, entre 1981 e 2019, dos 1881 medicamentos recém-aprovados pela FDA, aproximadamente 27% foram produtos naturais ou derivados, sendo que, na área oncológica, esse índice chega a 65%. Esses dados reforçam que os recursos vegetais continuam a desempenhar papel central na descoberta de novas entidades químicas bioativas, sejam como medicamentos diretamente extraídos de plantas, sejam como modelos estruturais para síntese de análogos.

O Brasil destaca-se nesse cenário por deter a maior biodiversidade do planeta, segundo o Ministério do Meio Ambiente, com cerca de 55 mil espécies vegetais descritas, o que corresponde a aproximadamente 20% da flora mundial (BRASIL, 2023). Essa diversidade representa um reservatório de compostos com estruturas químicas singulares, com elevado potencial para a indústria farmacêutica, cosmética e nutracêutica. Apesar desse patrimônio genético, o aproveitamento econômico e científico ainda é limitado. Uma revisão bibliográfica de artigos originais, identificados em três bases de dados e publicados entre 1970 e 2020 com foco na América Latina e no Caribe, indica que a produção científica anual sobre plantas medicinais cresceu entre 2000 e 2010 e, a partir daí, manteve-se estável. O estudo também mostra que quase dois terços dos artigos contam com ao menos um autor vinculado a instituições brasileiras (Alarcon Ruiz et al., 2023). No entanto, embora as pesquisas brasileiras se destaquem em cenário mundial, a lista dos 15 princípios ativos mais faturados, de acordo com dados do *Anuário Estatístico do Mercado Farmacêutico* da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, é dominada por biológicos e moléculas sintéticas, sem ocorrência de fitoterápicos, os quais, por sua vez, representam apenas cerca de 0,6% do faturamento industrial de medicamentos no país (ANVISA, 2023).

Entre as famílias botânicas de interesse, a Polygalaceae destaca-se por sua ampla distribuição geográfica e diversidade química, compreendendo o equivalente a 30 gêneros, sendo *Polygala* o mais abundante deles. No entanto, é importante destacar que, com base em evidências filogenéticas e morfológicas, o gênero *Polygala* L. passou a ser reconhecido como o gênero *Senega Spach*, um gênero com cerca de 229 espécies (Pastore et al., 2023), das quais 127 ocorrem no Brasil (*Flora e Funga do Brasil*, 2025). Esse gênero está ausente apenas na Nova Zelândia e nas zonas ártica e antártica (Lüdtke; Souza-Chies; Miotto, 2013).

No litoral brasileiro, espécies de *Senega* são comuns em áreas costeiras de solos arenosos, distribuindo-se da Bahia ao Rio Grande do Sul. Muitas contêm elevadas concentrações de salicilatos — como o salicilato de metila — responsável por seu odor característico (Rocha, 2012). Essas espécies são tradicionalmente utilizadas em aplicações tópicas para tratar entorses, lesões e artropatias crônicas, sobretudo nos estados ao norte da Bahia, onde recebem o nome popular “erva-iodex” (Lorenzi; Matos, 2002). Espécies dessa família são conhecidas por conter compostos químicos com atividades analgésica, expectorante, sedativa, antifúngica, entre outras (Lapa, 2006). O estudo intensivo e o crescente interesse em metabólitos secundários específicos de diversas espécies vegetais são atualmente essenciais devido às suas amplas aplicações nas áreas de nutrição e saúde (Simsek; Whitney, 2024).

Diante desse panorama, este estudo tem como objetivo investigar, por meio de uma abordagem integrada *in vitro* e *in silico*, o potencial biológico e o perfil químico de espécies do gênero *Senega*. Especificamente, buscou-se caracterizar o perfil cromatográfico dos extratos, isolar e identificar metabólitos secundários de *S. trichosperma* e *S. pulchella*, e avaliar as propriedades biológicas de extratos, frações e substâncias isoladas. Essa investigação visa ampliar o conhecimento fitoquímico do gênero e destacar seu potencial como fonte de moléculas com relevância farmacológica.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

Esta seção apresenta o arcabouço conceitual que sustenta o estudo, situando-o no contexto taxonômico, fitoquímico e bioativo do grupo investigado. Inicialmente (2.1), descreve-se a família Polygalaceae, com ênfase em aspectos de distribuição, morfologia e particularidades anatômicas relevantes ao reconhecimento taxonômico. Em seguida (2.2), aborda-se o gênero *Senega*, contemplando sua diversidade, padrões biogeográficos e informações de interesse etnobotânico. Na sequência (2.3), sintetiza-se o perfil fitoquímico característico do gênero, com destaque para xantonas, cumarinas, saponinas e outros fenólicos. Por fim (2.4), discute-se o panorama de atividades biológicas atribuídas a essas classes de metabólitos, com foco em evidências de interesse farmacológico (ações antimicrobianas, antioxidantes e inibição de colinesterases) e nas lacunas que motivam a investigação aqui proposta. Esse percurso teórico fornece os fundamentos para as escolhas metodológicas e para a formulação das hipóteses testadas nos tópicos subsequentes.

### 2.1 Família Polygalaceae

A família Polygalaceae compreende 30 gêneros, e está representada no Brasil por duas das quatro tribos existentes: Diclidanthereae e Polygaleae; as tribos Xanthophylleae e Carpolobieae não ocorrem. Não é uma família endêmica do país, apresentando-se como arbusto, árvore, erva, liana/volúvel/trepadeira ou subarbusto (*Flora e Funga do Brasil*, 2025). Esse táxon apresenta aproximadamente 1.200 espécies com ampla distribuição mundial, com centros de diversidade em regiões temperadas quentes e tropicais (Pastore et al., 2019). As espécies desse grupo são conhecidas por conter compostos químicos que exibem atividades analgésica, expectorante, sedativa, antifúngica, entre outras (Lapa, 2006). O potencial terapêutico do salicilato de metila, de xantonas, de algumas saponinas e de outros metabólitos encontrados nas espécies pertencentes a essa família tem despertado o interesse de pesquisadores, dada a relevância desses estudos fitoquímicos e farmacológicos.

No Brasil, essa família está representada pelos gêneros: *Acanthocladus* Klotzsch ex Hassk., *Asemeia* Raf. emend. Small, *Badiera* DC., *Barnhartia* Gleason, *Bredemeyera* Willd., *Caamembeca* J.F.B. Pastore, *Comesperma* Labill., *Diclidanthera* Mart., *Gymnospora* (Chodat) J.F.B. Pastore, *Hebecarpa* (Chodat) J.R. Abbott, *Hualania* Phil., *Monnina* Ruiz & Pav., *Moutabea* Aubl., *Senega* L., *Securidaca* L. (*Flora e Funga do Brasil*, 2025), e 229 espécies,

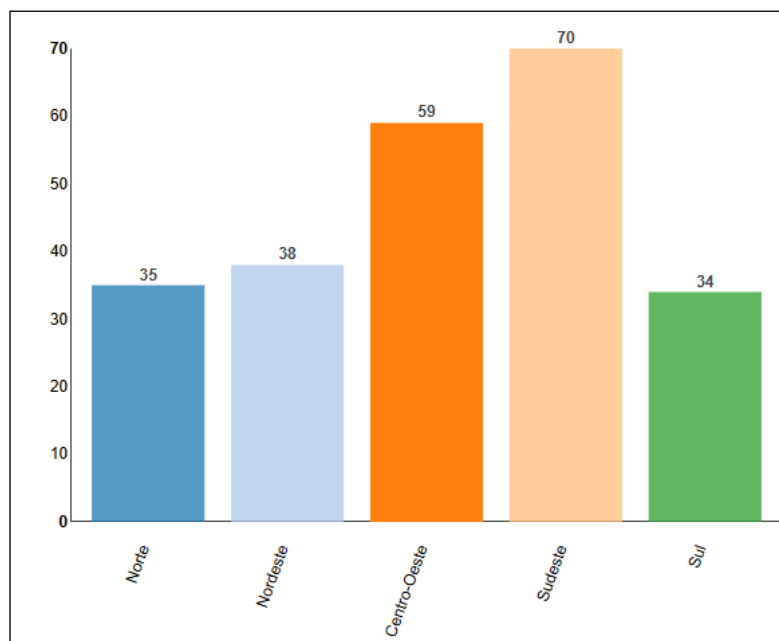
dos quais o gênero *Senega* é um dos mais representativos, com 127 espécies (The Brazil Flora Group - BFG, 2015).

Fisiologicamente, as plantas desse táxon comumente apresentam estruturas secretoras com valor diagnóstico nos níveis genérico e específico. Contudo, o conhecimento a seu respeito ainda é incipiente e, com frequência, sua ocorrência é registrada apenas de forma qualitativa (presença/ausência). Entre essas estruturas, destacam-se os nectários extraflorais nodais, glândulas ou tecidos especializados que secretam néctar em órgãos vegetativos e atuam como mecanismo defensivo indireto contra herbívoros (Filgueira; Kikuchi; Coelho-Ferreira, 2016).

## 2.2 Gênero *Senega*

O gênero *Senega* constitui o segundo maior em número de espécies dentro da família Polygalaceae, que compreende cerca de 30 gêneros (Pastore et al., 2023). Engloba aproximadamente 229 espécies distribuídas sob formas herbáceas, arbustivas e subarbustivas (Flora e Funga do Brasil, 2025), com ocorrência principalmente na América do Norte, Central e do Sul, além de registros nas Índias Ocidentais e em regiões da África Subsaariana. Evidências filogenéticas recentes demonstraram que *Senega* representa o clado neotropical anteriormente incluído em *Polygala*, o qual, após revisão taxonômica, foi restringido ao Velho Mundo (Pastore et al., 2019; 2023). Assim, *Senega* diferencia-se de *Polygala* não apenas por critérios morfológicos e biogeográficos, mas também por sua história evolutiva distinta.

No Brasil, *Senega* apresenta elevada representatividade, com cerca de 127 espécies registradas, das quais 87 são endêmicas (Flora e Funga do Brasil, 2025). A distribuição nacional é heterogênea, sendo a região Sudeste a mais diversa (Figura 1), com 70 espécies, seguida pelas regiões Centro-Oeste (59), Nordeste (38), Norte (35) e Sul (34). Esse padrão pode refletir tanto diferenças no esforço de coleta e investigação botânica, especialmente concentrado no Sudeste (Forzza et al., 2012), quanto a existência de áreas ainda subexploradas em termos de prospecção taxonômica e química, particularmente no Centro-Oeste e Nordeste, onde há elevado número de espécies endêmicas.



**Figura 1.** Distribuição do número de espécies de *Senega* por região geográfica do Brasil

Fonte: *Flora e Funga do Brasil* (2025)

As espécies de *Senega* apresentam características morfológicas que permitem sua distinção dentro da família, incluindo caules delgados, hábito herbáceo a arbustivo, folhas com ou sem glândulas amareladas, inflorescências em racemos axilares ou terminais, cálice persistente no fruto (por vezes apresentando glândulas esbranquiçadas ou amareladas) e cápsulas biloculares. Atualmente, reconhecem-se três subgêneros: *Senega*, *Clinclinia* (DC.) J.F.B. Pastore & Agust. Martinez, e *Monninopsis* (S.F. Blake) J.F.B. Pastore & J.R. Abbott (Pastore, 2016; 2018; Pastore et al., 2023).

Espécies deste gênero possuem ampla utilização na medicina tradicional em diversas regiões do mundo, sendo-lhes atribuídas atividades expectorantes, sedativas, antipsicóticas, antiofídicas, antifúngicas e analgésicas (Lapa, 2006). Tais propriedades têm sido associadas à presença de metabólitos como salicilatos, incluindo salicilato de metila, responsável por parte da atividade analgésica (Lorenzi; Matos, 2002; Nogueira et al., 2005; Rocha, 2012). Revisões fitoquímicas e farmacológicas recentes indicam ainda a ocorrência de saponinas triterpênicas, terpenoides, xantonas, flavonoides, cumarinas, ésteres de oligossacarídeos, compostos esterilbenzoicos, benzofenonas e polissacarídeos, associados a atividades anti-inflamatórias, neuroprotetoras, anti-isquêmicas, antidepressivas, sedativas, analgésicas, antitrombóticas, antitumorais e inibitórias de enzimas relevantes (Lacaille-Dubois, Delaude & Mitaine-Offer, 2020).

No contexto deste estudo, *Senega pulchella* e *Senega trichosperma* são espécies de particular interesse. *S. pulchella* é uma erva endêmica do Brasil, ocorrendo principalmente nas regiões Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), em áreas de Mata Atlântica (Flora e Funga do Brasil, 2025). Já *S. trichosperma*, com hábito herbáceo a subarborescente, não é endêmica, apresentando distribuição mais ampla, com registros nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste, associada aos domínios Amazônia e Caatinga (Flora e Funga do Brasil, 2025). Essa diferença fitogeográfica sugere potenciais distinções adaptativas e metabólicas entre ambas, reforçando a relevância de estudos comparativos envolvendo composição química e atividade biológica.

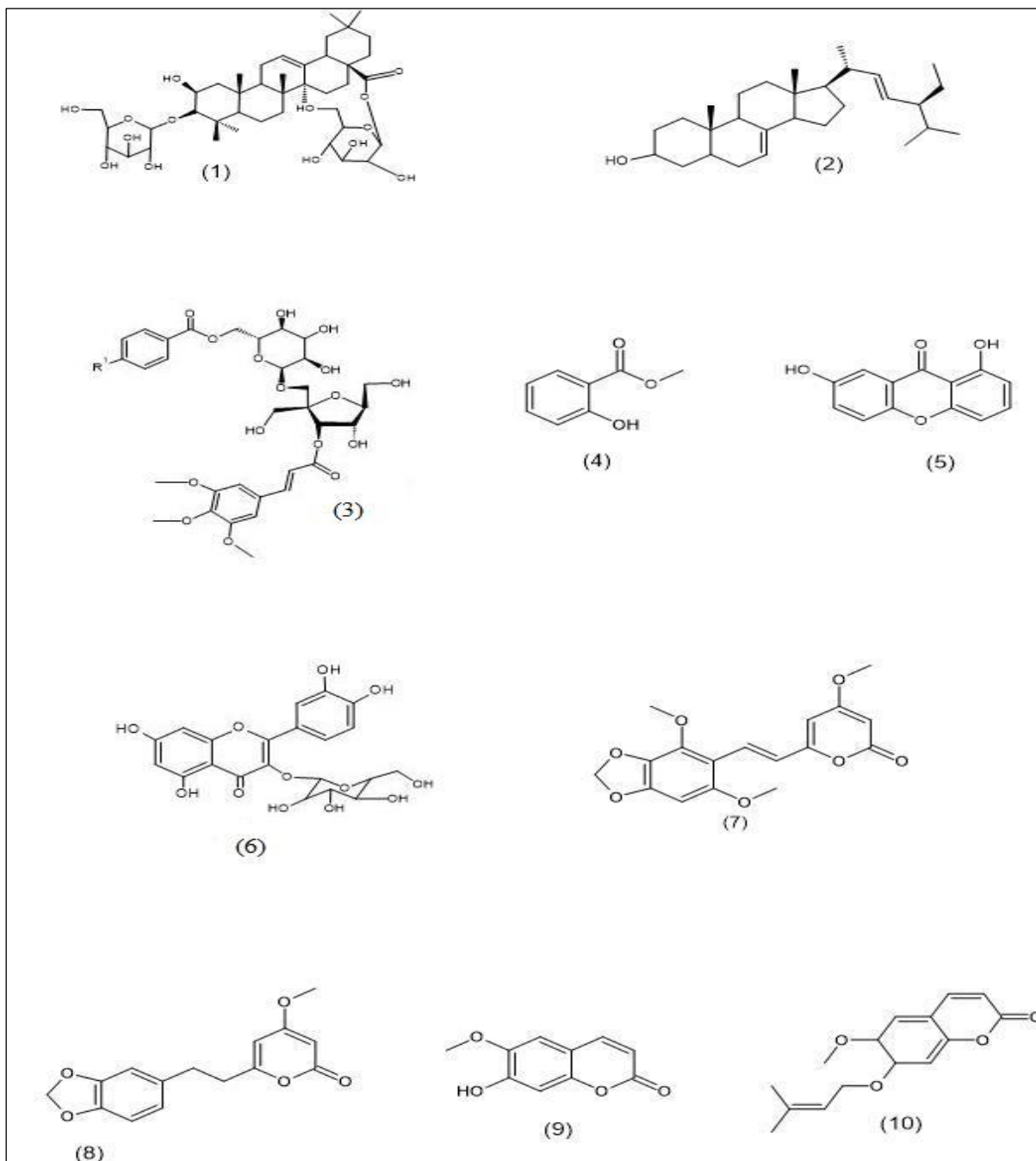
### 2.3 Classe de Metabólitos Comuns em *Senega* spp

O metabolismo vegetal é dividido em primário e secundário. O metabolismo primário envolve processos essenciais ao crescimento e manutenção da vida vegetal, como fotossíntese, respiração e transporte de solutos. Já o metabolismo secundário compreende rotas biossintéticas que originam compostos não universalmente distribuídos, específicos de determinadas famílias, gêneros ou espécies vegetais. Tais compostos podem atuar como marcadores taxonômicos e são responsáveis por muitas das propriedades organolépticas e farmacológicas das plantas (Castro et al., 2005; Taiz et al., 2017; Benett & Wallsgrove, 1994; Vanhaelen et al., 1991). A síntese de metabólitos secundários resulta da interação entre fatores genéticos, estágio de desenvolvimento e condições ambientais, como clima, tipo de solo e época de coleta (Santos et al., 2010).

Diversas funções ecológicas têm sido atribuídas a esses metabólitos, incluindo defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra radiação UV e atração de polinizadores ou dispersores de sementes (Wink, 1990; Rhodes, 1994). Além disso, os efeitos medicinais e/ou tóxicos das plantas geralmente estão relacionados à presença dessas substâncias, as quais constituem a principal classe de compostos vegetais de interesse farmacológico. As principais classes de metabólitos secundários relatadas na literatura incluem taninos, flavonoides, alcaloides, cumarinas, antraquinonas e saponinas (Simões et al., 2010).

No gênero *Senega* (Polygalaceae), estudos fitoquímicos revelaram a ocorrência de uma ampla diversidade de metabólitos secundários. Dentre os grupos mais frequentes destacam-se: saponinas triterpênicas (1) (Zhang et al., 1995; 1998), esteroides (2) (Borges et al., 2014a; Junior, 2002), oligossacarídeos esterificados (3) (Miyase, Noguchi & Chen, 1999; Ling et al., 2013), derivados fenólicos simples, incluindo o salicilato de metila (4) (da Rocha, 2012),

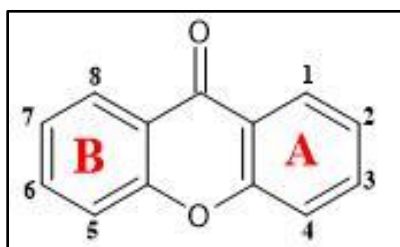
xantonas (5) (Dao et al., 2012; Li et al., 2014), flavonoides (6) (Martins et al., 2009; Jiayue et al., 2019), (7,8) esterilpironas e di-hidroesterilpironas, (Pizzolatti, 2004; Tizziani, 2019), bem como, cumarinas (9,10) (Capra et al., 2010; Silva, 2020). Esses compostos estão ilustrados na Figura 2.



**Figura 2.** Principais classes de metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Senega* (Polygalaceae). (1) saponina triterpênica; (2) esteróide; (3) oligossacarídeo esterificado; (4) salicilato de metila; (5) xantona; (6) flavonoide; (7) esterilpirona e (8) dihidroesterilpirona; (9) e (10) cumarina.

Fonte: Adaptado de Lopes (2022)

As xantonas merecem destaque, pois representam um dos principais grupos marcadores do gênero. O termo “xantona” deriva do grego *xanthos* (“amarelo”), em alusão à cor característica desses metabólitos. Estruturalmente, possuem um núcleo dibenzo- $\gamma$ -pirona e diferenciam-se quanto ao padrão e quantidade de substituições fenólicas — que podem ocorrer na forma livre, como éteres metílicos, grupos metilenodioxi ou acetais glicosídicos (Figura 3). A literatura descreve predominantemente o padrão C de substituição no anel benzênico, sendo sua química notoriamente rica devido ao efeito doador-aceptor conjugado do anel B, que confere alta relevância para interações biológicas (Dewick, 2009; Junior, 2002; Missau, 2008; Tizziani, 2019).



**Figura 3.** Estrutura química que configura o núcleo de uma xantona

Fonte: Elaboração própria

Além das xantonas, outras classes como flavonoides, cumarinas, estilpironas e di-hidroestirilpironas também são frequentes nas espécies de *Senega*, contribuindo para o potencial farmacológico desse gênero (Harborne, 2010). Estudos realizados pelo Grupo de Pesquisas em Substâncias Naturais Bioativas (UEFS) têm confirmado a presença de salicilato de metila em *Polygala decumbens*, constituinte utilizado em formulações analgésicas, além de atividades antinociceptivas observadas para extratos de *Senega boliviensis* (Rocha, 2012). Mais recentemente, Silva et al. (2016) isolaram dessa espécie um novo metabólito denominado poligaleno, uma cumarina com atividade imunomoduladora promissora, reforçando a importância farmacológica das espécies pertencentes à família Polygalaceae.

## 2.4 Atividades Biológicas Características do Gênero

Diversas espécies do gênero *Senega* têm sido avaliadas quanto ao seu potencial biológico, revelando um amplo espectro de atividades farmacológicas. Entre as ações mais frequentemente relatadas destacam-se a atividade anti-inflamatória, a ação antioxidante e o efeito hipoglicemiante, além de propriedades neuritogênicas e neuroprotetoras. Também foram descritos efeitos relacionados à melhoria da memória (efeitos mnemônicos) e moduladores do

sistema nervoso central, incluindo atividades antipsicótica, anticonvulsionante, antidepressiva e antidistresse. Esses efeitos têm sido observados tanto em extratos brutos quanto em frações de diferentes espécies do gênero, sendo atribuídos à presença de metabólitos secundários como cumarinas, flavonoides, xantonas, di-hidroestirilpironas e estirilpironas, cuja relação com essas atividades já foi estabelecida em estudos fitoquímicos e farmacológicos (Brighente et al., 2007; Farina et al., 2005; Pereira, 2017; Rocha et al., 2019). De forma sintética, a Tabela 1 apresenta um panorama das principais atividades biológicas reportadas para espécies de *Senega*, evidenciando seu potencial como fonte de compostos bioativos de interesse farmacológico.

**Tabela 1.** Principais atividades biológicas atribuídas a algumas espécies do gênero *Senega*

<b>ESPÉCIE</b>	<b>ATIVIDADE BIOLÓGICA</b>	<b>CLASSE DE METABÓLITOS</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
<i>S. cyparissias</i>	Antinociceptiva Antiulcerogênica Antihiperalgésica Antiulcerogênica	Xantona Esterol Xantonas	(de Campos et al., 1997) (Klein J. et al., 2010) (Klein J. et al., 2012) (Klein J. et al., 2013)
<i>S. sellowiana</i>	Antidepressiva Antifúngica Tripanocida	Cumarina Cumarina	Capra et al., 2010 Johann et al, 2011 Pizolatti et al., 2008
<i>S. boliviensis</i>	Potencial efeito imunomodulador	Cumarina	Silva, et al., (2016)

Fonte: Silva et al. (2016); Tizziani (2019)

Apesar da diversidade de espécies que compõem o gênero, muitas ainda permanecem pouco exploradas do ponto de vista químico e biológico, o que evidencia a relevância do presente trabalho em ampliar o conhecimento sobre a química e a bioatividade de *Senega*, contribuindo para a valorização e o melhor aproveitamento farmacológico dessas plantas.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Materiais e equipamentos

Os solventes utilizados para as etapas de extração, partição líquido-líquido e eluição cromatográfica foram de grau analítico (Synth, Qhemis, Êxodo, Química Moderna), incluindo hexano, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol. A secagem do material vegetal foi realizada em estufa de circulação de ar forçada (Quimis, Brasil) a  $45 \pm 3$  °C, e a moagem do material seco foi conduzida em triturador industrial de lâminas (Metvisa, Brasil). As massas dos extratos e frações foram determinadas em balança analítica Shimadzu AU220 (Japão), enquanto a concentração dos extratos e frações orgânicas foi conduzida em evaporador rotativo IKA RV 10 (Alemanha).

As separações cromatográficas foram realizadas em colunas de vidro de diferentes dimensões, preenchidas com sílica gel 60 (0,063–0,200 mm; 70–230 mesh; Acros Organics, Alemanha) para cromatografia em coluna aberta (CC) e com sílica gel 60 (230–400 mesh; Acros Organics) para cromatografia flash e cromatografia de média pressão (MPLC). Para cromatografia por exclusão de tamanho (filtração em gel) utilizou-se Sephadex LH-20 (GE Healthcare, Suécia). A análise preliminar dos perfis cromatográficos foi conduzida por cromatografia em camada delgada (CCD), empregando placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Alemanha), visualizadas sob radiação UV a 254 e 365 nm (lâmpada Spectroline ENF-260C, EUA) e reveladas por exposição a vapores de iodo em câmara fechada.

Para as análises cromatográficas de alta eficiência, utilizou-se o sistema HPLC Ultimate 3000, equipado com injetor automático e detector UV de arranjo de diodos (DAD), acoplado à coluna Accucore C18 (100 mm × 2,1 mm i.d., 2,6 µm) (Thermo Scientific, EUA), com pré-coluna Accucore C18 (10 × 2,1 mm, 2,6 µm) do mesmo fabricante. Os solventes empregados foram acetonitrila e metanol grau HPLC e água purificada obtida em sistema GEHAKA MS3000, com adição de ácido fórmico, conforme necessário, para ajustes de fase móvel.

As recristalizações foram realizadas em frascos de vidro âmbar, utilizando placa de aquecimento com agitação magnética (IKA, Alemanha), seguidas de resfriamento lento em refrigerador vertical Consul (Brasil). Processos de sonicação foram conduzidos em banho ultrassônico Ultrasonic Cleaner (Unique, Brasil; 250 W, 40 kHz).

Para as análises envolvendo quantificação espectrofotométrica e ensaios biológicos, utilizou-se o leitor de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientific, EUA), permitindo leituras em diferentes comprimentos de onda com controle de absorvância em microplacas de 96 poços.

As análises espectroscópicas incluíram espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz), realizadas em espectrômetro Bruker Avance III HD 500 (Bruker, Alemanha), utilizando  $\text{CDCl}_3$  ou  $\text{DMSO-}d_6$  (Sigma-Aldrich, EUA) como solventes deuterados e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os espectros de infravermelho foram adquiridos por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada (ATR-FTIR), no equipamento Cary 630 FTIR Spectrometer (Agilent, EUA). As análises de espectrometria de massas foram realizadas por ionização por eletrospray em espectrômetro de armadilha de íons (ESI-MS, LCQ Fleet, Thermo Fisher Scientific, EUA).

### 3.2 Material vegetal

As espécies *Senega trichosperma* e *Senega pulchella* foram identificadas pelo botânico Prof. Dr. José Floriano Barea Pastore. Para *S. trichosperma*, uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS), registrada como *Polygala trichosperma* (sinônimo de *Senega trichosperma*), sob o número HUEFS0043030, proveniente de amostra coletada no campus da UEFS, em Feira de Santana, BA ( $12^\circ 16' 00''$  S;  $38^\circ 58' 00''$  W), totalizando aproximadamente 3 kg de planta inteira (Figura 4A). A espécie *S. pulchella* foi igualmente identificada pelo Prof. Dr. José Floriano Barea Pastore (Figura 4B), coletada no campus da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC ( $27^\circ 16' 58''$  S;  $50^\circ 35' 04''$  W), e uma exsicata foi depositada no Herbário de Curitiba/UFSC (CTBS) como *Polygala pulchella* (sinônimo de *Senega pulchella*), sob o código CTBS 5001, referente à amostra coletada em Curitiba, SC. Foi obtida uma massa aproximada de 1,5 kg de planta inteira. Ambas as espécies encontram-se registradas no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) sob o código A50D961.



**Figura 4.** (A) *Senega trichosperma*; (B) *Senega pulchella*

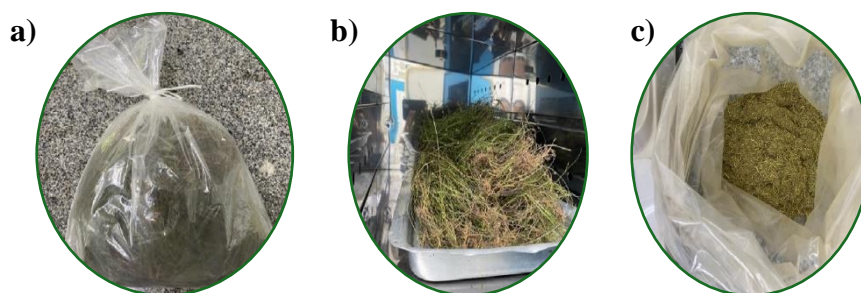
Fonte: Flora do Brasil (2020)

### 3.3 Preparação de extratos e frações

#### 3.3.1 Métodos de extração empregados

O material (partes aéreas e raízes) de *S. pulchella* foi seco em estufa a  $45 \pm 3$  °C até peso constante, triturado (Figura 5) e dividido em quatro porções (~20 g cada) para comparação entre métodos/solventes:

- Soxhlet/MeOH: 20,0265 g
- Maceração/MeOH: 20,0309 g
- Maceração/EtOH: 20,0231 g
- Ultrassom/MeOH: 20,2213 g



**Figura 5.** *Senega pulchella*: a) recebido após a coleta b) após o processo de secagem em estufa c) triturado

Fonte: Elaboração própria

##### 3.3.1.1 Maceração

Aproximadamente 20 g de amostra foram extraídos com 200 mL do respectivo solvente (metanol ou etanol) em erlenmeyers de 500 mL, os quais foram vedados com algodão e cobertos com papel-alumínio. A maceração ocorreu por 48 h, em cinco repetições. Os filtrados foram combinados e concentrados em evaporador rotativo, os solventes foram recuperados para reuso (Figura 6).



**Figura 6.** Extração por maceração

Fonte: Elaboração própria

### 3.3.1.2 Extração assistida por ultrassom

Para o processo de extração por ultrassom, foi utilizado um sonificador, Ultrasonic Cleaner (250 W, 40 kHz). As amostras foram acondicionadas em erlenmeyers de 125 mL ( $m_1=6,5626g$ ,  $m_2=6,5520g$ ,  $m_3=7,1067g$ ), em triplicata, com 90 mL de metanol, e submetidas à extração por aplicação de ondas ultrassônicas na solução em seu interior, promovendo agitação por cavitação (Figura 7). Esse processo ocorreu a 40 °C, em três ciclos de 10 minutos. Após o terceiro ciclo de extração na temperatura desejada, a mistura resultante foi filtrada e transferida para um evaporador rotativo sob vácuo, em que a amostra foi concentrada e o solvente metanol foi destilado a uma temperatura de 45 °C (procedimento adaptado de Rajabi et al., 2023).



**Figura 7.** Extração por ultrassom

Fonte: Elaboração própria

### 3.3.1.3 Extração por Soxhlet

Uma amostra de ~20 g foi encapsulada com papel filtro e acondicionada em um extrator soxhlet. Para a extração, foram utilizados 500 mL de metanol em balão de 1000 mL, conectado ao condensador e ao banho (Figura 8). O aquecimento foi realizado por uma manta, durante 12 h (Królicka, 2006). Ao final, o solvente foi removido em evaporador rotativo.



**Figura 8.** Extração por soxhlet

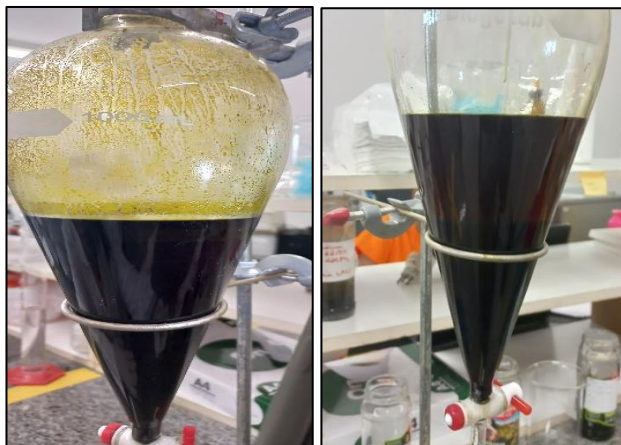
Fonte: Elaboração própria

### 3.3.2 Obtenção dos extratos de *Senega trichosperma* e *Senega pulchella*

Partes aéreas e raízes foram secas em estufa a  $45 \pm 3$  °C até peso constante, trituradas em liquidificador industrial e submetidas a maceração estática em metanol por 48h, repetida cinco vezes. Os filtrados combinados foram concentrados em evaporador rotativo (banho a  $50 \pm 1$  °C), obtendo-se o extrato bruto (EB) que, em seguida, foi particionado com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade, resultando nas frações hexânica (FH), clorofórmica (FC) e acetato de etila (FAC).

### 3.3.3 Partição líquido-líquido das frações

1. Obtenção da Fase Hexânica (FH): o EB foi ressuspenso em metanol:água (9:1, v/v) e particionado com hexano em três sucessivas extrações, usando, a cada etapa, volume de hexano equivalente a 1/3 do volume da fase hidroalcoólica. As fases orgânicas foram combinadas e concentradas em evaporador rotatório (Figura 9).



**Figura 9.** Partição do extrato bruto com hexano

Fonte: Elaboração própria

2. Obtenção da Fase Clorofórmica (FC): a fase remanescente foi ajustada para metanol:água (6:4, v/v) e particionada com clorofórmio (mesma estratégia de três extrações). A fase clorofórmica foi recuperada e concentrada (Figura 10).



**Figura 10.** Partição do extrato bruto com clorofórmio

Fonte: Elaboração própria

3. Obtenção da Fase Acetato de Etila (FAC): após remoção do metanol da fase aquosa remanescente, procedeu-se à partição com acetato de etila; a fase orgânica foi coletada e concentrada (Figura 11).



**Figura 11.** Partição do extrato bruto com acetato de etila

Fonte: Elaboração própria

A fase hidroalcoólica restante após todas as etapas de partição foi igualmente coletada e concentrada, constituindo a fração hidroalcoólica (FHIDRO).

As frações secas foram pesadas e os rendimentos (%) calculados como  $\frac{m(\text{extrato ou fração})}{m \text{ seca}} \times 100$ .

### 3.4 Isolamento dos constituintes de *Senega trichosperma*

#### 3.4.1 Fração Hexânica (STFH)

A fração hexânica (STFH) foi submetida à triagem por cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica gel (Merck). Testaram-se, como fases móveis: (i) hexano; (ii) hexano:diclorometano (7:3); (iii) hexano:diclorometano (1:1); (iv) hexano:clorofórmio (7:3); (v) hexano:acetona (9:1); (vi) hexano:acetato de etila (7:3); e (vii) hexano:acetato de etila (1:1). As placas foram reveladas em câmara UV 254/365 nm e/ou vapores de iodo. O sistema hexano:acetona (8:2) apresentou a melhor resolução, servindo de base para a etapa subsequente de cromatografia em coluna.

A STFH (45 g) foi fracionada por cromatografia em coluna (CC) sobre sílica gel 60 (0,063–0,200 mm; 70–230 mesh; Acros) empregando gradiente de crescente polaridade (hexano → acetona → metanol). Obtiveram-se as subfrações (massa total e sistema de eluição principal), conforme descrito na Tabela 2. As frações coletadas foram agrupadas por similaridade do fator de retenção (RF) apresentadas pelas análises de CCD (UV 254/365 nm e/ou iodo).

**Tabela 2.** Subfrações obtidas da STFH, com suas respectivas massas e fase móvel utilizada na extração

AMOSTRA	SUBFRAÇÃO (CÓDIGO)	ELUENTE	MASSA (g)
STFH	STFH-A	HEXANO	8,6686
	STFH -B	HEXANO/ACETONA (95/5); HEXANO/ACETONA (8/2)	21,6752
	STFH -C	HEXANO/ACETONA (7/3)	10,7277
	STFH -D	HEXANO/ACETONA (1/1)	2,1423
	STFH -E	ACETONA	1,4501
	STFH -F	ACETONA/METANOL (1/1)	1,9104
	STFH -G	METANOL	1,1630

Fonte: Elaboração própria

#### 3.4.1.1 STFH-A3 - Substância 1

A fração STFH-A foi submetida à CC, originando os agrupamentos STFH-A1 a STFH-A7 (Tabela 3). A subfração STFH-A3 (extraída em hexano/acetona nas proporções 8/2 e 7/3) apresentou formação de sólidos, os quais resultaram na substância **1** (0,028 g), que foi encaminhada ao Laboratório Baiano de Ressonância Magnética Nuclear (LABAREMN) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), onde foram avaliados por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear operando a 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), usando clorofórmio como solvente, e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno para obtenção dos espectros unidimensionais que subsidiaram a elucidação estrutural.

**Tabela 3.** Agrupamentos obtidos da CC da STFH-A

STFH	Código	Frações agrupadas	Massa (g)
STFH-A (m=8,6686g)	STFH-A1	1 a 34	1,0786
	STFH -A2	35 a 42	1,0012
	STFH -A3	43 a 52	0,2818
	STFH -A4	53 a 100	1,2619
	STFH -A5	101 a 145	1,5986
	STFH -A6	146 a 211	0,9482
	STFH-A7	212 e 292	1,4070

Fonte: Elaboração própria

### 3.4.1.2 STFH-B5 – Substância 2

A fração STFH-B foi submetida à cromatografia em coluna (CC) sobre sílica gel 60 (0,063–0,200 mm; 70–230 mesh; Acros), utilizando um gradiente de eluição de hexano → metanol em proporções crescentes de polaridade. As frações eluídas foram coletadas em alíquotas de 100 mL, monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD, revelação sob UV 254/365 nm e vapores de iodo), e agrupadas por similaridade de perfis cromatográficos, originando os agrupamentos STFH-B1 a STFH-B5 (massas descritas na Tabela 4).

Em seguida, uma alíquota de STFH-B5 (0,7574 g) foi adsorvida em sílica gel flash (230–400 mesh) e submetida à cromatografia líquida de média pressão (MPLC), empregando sistema isocrático de clorofórmio:hexano (6:4, v/v), com detecção a 256 nm. Esse processo resultou em mais de 80 subfrações, posteriormente avaliadas por CCD. Por meio de recristalização (dissolução a quente, filtração e resfriamento lento dos filtrados), obtiveram-se cristais amarelos (0,043 g, solúveis em clorofórmio), correspondentes à substância 2 (STFH-B5), cuja estrutura foi determinada com base na análise dos dados espectroscópicos de RMN e confirmada por comparação com dados descritos na literatura.

**Tabela 4.** Subfrações obtidas da STFH-B, que levaram ao isolamento do composto purificado STFH-B5.2 e suas respectivas massas

STFH	Código	Frações	Massa (g)		Código	Frações	Massa (g)
	(Obtidas de CC)	agrupadas			(Obtidas de MPLC)	agrupadas	
(m=16,5566g)	STFH-B1	1 a 100	4,2367	STFH-B5	STFH-B5.1	1 a 12	0,1145
	STFH-B2	101 a 145	4,1564		STFH-B5.2	13 a 30	0,2692
	STFH-B3	146 a 211	3,1622		STFH-B5.3	31 a 88	0,2153
	STFH-B4	212 a 281	3,1018				
	STFH-B5	282 a 292	1,4985		(m=0,6023g)		

Fonte: Elaboração própria

### 3.4.2 Fração Clorofórmica (STFC)

A fração clorofórmica (STFC, ≈5,48 g) foi submetida à triagem cromatográfica em camada delgada (CCD) para definição do sistema de eluição mais adequado, sendo testadas diferentes proporções de solventes orgânicos. O sistema hexano:acetona (7:3, v/v) apresentou

melhor resolução e separação dos constituintes, sendo, portanto, selecionado para a etapa subsequente.

Na sequência, a STFC foi fracionada por cromatografia em coluna (CC) sobre sílica gel 60 (0,063–0,200 mm; 70–230 mesh; Acros), empregando um gradiente de solventes em ordem crescente de polaridade (hexano → acetona → metanol). As frações eluídas foram coletadas em alíquotas de aproximadamente 100 mL, monitoradas por CCD (revelação sob UV 254/365 nm e vapores de iodo) e agrupadas de acordo com a similaridade de seus perfis cromatográficos, originando as subfrações STFC-A a STFC-G, com suas respectivas massas descritas na Tabela 5.

#### 3.4.2.1 STFC-C2 – Substância **3**

A subfração STFC-C, previamente obtida por cromatografia em coluna da fração clorofórmica de *S. trichosperma*, foi submetida a uma etapa adicional de purificação por cromatografia em coluna de exclusão por tamanho (gel filtração) utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária e uma mistura de diclorometano:metanol (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, 1:1, v/v) como fase móvel. As frações eluídas foram monitoradas por CCD (sílica gel, revelação sob UV 254/365 nm e vapores de iodo), sendo aquelas com perfis cromatográficos semelhantes combinadas, o que resultou na obtenção da subfração STFC-C2 — substância **3** (Tabela 5).

Durante a concentração das frações obtidas na eluição, observou-se formação espontânea de precipitado, o qual foi submetido a recristalização em metanol resfriado (4 °C), proporcionando um sólido cristalino de coloração amarelada, com massa final de 0,086 g e solubilidade moderada em clorofórmio.

O material obtido foi então encaminhado para análise espectroscópica por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), sendo adquiridos espectros de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C (500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS como padrão interno), com vistas à elucidação estrutural detalhada da substância, conforme descrito na seção de Resultados e Discussão.

**Tabela 5.** Subfrações obtidas da STFC, que levaram ao isolamento do composto purificado STFC-C2, e suas respectivas massas

STFC	Código (Obtidas de CC)	Frações agrupadas	Massa (g)		Código (Obtidas de Sephadex)	Frações agrupadas	Massa (g)
	STFC-A	1 a 6	0,4651		STFC-C1	1 a 5	0,023
	STFC -B	7 a 17	0,6367	STFC-C	STFC-C2	6 a 14	0,086
	STFC -C	18 a 26	1,1325	(m=0,0234g)	STFC-C3	15 a 35	0,052
	STFC -D	27 a 48	1,1014		STFC-C4	36 a 46	0,033
	STFC -E	49 a 65	0,8876		STFC-C5	47 a 60	0,019
	STFC -F	66 a 87	0,5587				
	STFC -G	88 a 112	0,4293				

Fonte: Elaboração própria

### 3.5 Isolamento dos constituintes de *Senega pulchella*

#### 3.5.1 Fração Clorofórmica (SPFC)

A fração clorofórmica (SPFC), obtida do extrato metanólico de *S. pulchella*, foi inicialmente submetida à triagem cromatográfica por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando clorofórmio:acetona (9:1, v/v) como sistema de eluição. As placas foram reveladas sob radiação UV a 254 e 365 nm e posteriormente expostas a vapores de iodo para detecção de compostos não cromóforos.

Com base na separação observada, uma alíquota de 3,6 g de SPFC foi fracionada por cromatografia em coluna aberta (CC) sobre sílica gel 60 (0,063–0,200 mm; 70–230 mesh; Acros), empregando um gradiente de solventes em ordem crescente de polaridade (clorofórmio → acetona → metanol). As frações foram coletadas em alíquotas de aproximadamente 100 mL, monitoradas por CCD (sílica gel, revelação UV 254/365 nm e vapores de iodo) e agrupadas conforme a similaridade de seus perfis cromatográficos, originando as seguintes subfrações e rendimentos: SPFC-A (frações 1–17; 50,6 mg), SPFC-B (18–116; 368,7 mg), SPFC-C (117–137; 47,0 mg), SPFC-D (138–168; 201,2 mg), SPFC-E (169–181; 666,3 mg; maior rendimento), SPFC-F (182–223; 412,3 mg), SPFC-G (224–240; 222,6 mg) e SPFC-H (241–253; 101,1 mg).

### 3.5.1.1 SPFC-C – Substância 4

A subfração SPFC-C (47,0 mg) apresentou um componente majoritário de coloração amarelada visível em CCD. O material foi submetido à purificação por precipitação seletiva em clorofórmio, seguida de recristalização em acetona, resultando em um sólido cristalino amarelo. A amostra foi caracterizada por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz), e DEPT, incluindo experimentos bidimensionais, HMQC e HMBC, bem como por infravermelho (IV) e espectrometria de massas (EM), permitindo a identificação da substância isolada como a substância **4**, descrita pela primeira vez em *S. pulchella*.

### 3.5.2 Fração Acetato de Etila (SPFAC)

A fração de acetato de etila (SPFAC), também derivada do extrato metanólico de *S. pulchella*, foi inicialmente avaliada por CCD, empregando os mesmos sistemas cromatográficos e métodos de revelação descritos para SPFC. Em seguida, uma alíquota de 1,2 g de SPFAC foi submetida à cromatografia em coluna aberta (CC) sobre sílica gel 60 (0,063–0,200 mm; 70–230 mesh), utilizando um gradiente de polaridade progressivo (hexano → clorofórmio → acetona → metanol). As frações obtidas ( $\approx 100$  mL) foram monitoradas por CCD e agrupadas de acordo com a similaridade dos perfis cromatográficos, originando as seguintes subfrações e rendimentos: SPFAC-A (1–8; 100,3 mg), SPFAC-B (9–12; 35,7 mg), SPFAC-C (13–18; 150,5 mg), SPFAC-D (19–40; 220,8 mg) e SPFAC-E (41–72; 520,7 mg).

#### 3.5.2.1 SPFAC-C Substância 5

A subfração SPFAC-C (150,5 mg) apresentou coloração amarelada e revelou, por CCD, um perfil cromatográfico caracterizado pela presença predominante de um único constituinte majoritário. O material foi submetido à recristalização em metanol resfriado (4 °C), resultando em um sólido cristalino identificado como a substância 5. A caracterização estrutural foi realizada por RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz), incluindo DEPT, HMQC e HMBC, além de análises por IV e EM.

## 3.6 Análise do perfil químico por CLAE-DAD

### 3.6.1 Preparação das amostras

Cada um dos extratos brutos (SPMM, SPME, SPSOX e SPULT e ST) foi solubilizado em metanol grau HPLC (10 mg/mL). Para isso, as amostras e padrões foram submetidas à ultrassonicação por dois minutos para facilitar a dissolução completa e encaminhadas à técnica de *clean-up* com cartucho de extração em fase sólida Cleanert ODS C18, adaptada a filtro Syringe filters- K18-230, com membrana de poro de 0,45 µm para filtração das amostras e retenção dos interferentes. O cartucho foi previamente condicionado com 5 mL de metanol e, em seguida, 2 mL das amostras foram submetidas ao cartucho e eluídas com pressão positiva, utilizando bomba de pressão. Para os padrões comerciais (ácido caféico, ácido salicílico e rutina) e substância isolada da fração clorofórmica da espécie (Substância 4), foram preparadas soluções em metanol grau HPLC (1 mg/mL). O mix desses padrões, por sua vez, foi preparado a 0,5 mg/mL. A curva analítica foi preparada com concentrações do mix de padrões variando entre 25 – 425 µg/mL, em escala de variação equidistante. Todas as amostras foram filtradas com filtros de membrana de éster de celulose 0,45 µm (Agela Technologies).

### 3.6.2 Condições da CLAE-DAD

As condições cromatográficas incluíram: volume de injeção de 10 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 acetonitrila (ACN) grau HPLC (A) e Ácido Fórmico a 0,1% (B) em sistema de gradiente, com fluxo de 0,6 mL/min. O gradiente de eluição aplicado foi: 0-3 min, 10% (A); 3-5 min, 15% (A) 5-8 min, 15% (A); 8-13 min, 20% (A); 13-18 min, 22,5% (A); 18-20 min, 25% (A) 20-25 min, 25% (A); 25-30 min, 30% (A); 30-35 min, 30% (A); (A); 35-40 min, 40% (A) 40-47 min, 95% (A); 47-52 min, 95% (A); (A); 52,1-57 min, 10% (A). O forno de colunas operou em 25 °C.

### 3.6.3 Análise das amostras

Os extratos (SPMM, SPME, SPSOX, SPULT e ST) 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 caféico, ácido salicílico e rutina) e substância isolada da espécie (Substância 4 - 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona). A identificação parcial das substâncias foi realizada comparando o tempo de

retenção e espectros no UV dos picos no cromatograma dos padrões com os das amostras. Para os picos majoritários não identificados que apresentaram um grau de pureza, foram avaliados os espectros no UV para sugerir a classe metabólica.

### 3.6.4 Quantificação

#### 3.6.4.1 Curva Analítica

Para os analitos ácido cafeico, ácido salicílico, rutina e xantona, as curvas analíticas foram construídas a partir de nove níveis de concentração, preparados em triplicata, utilizando soluções estoque padrão de cada substância em metanol. As curvas de rutina e xantona iniciaram na concentração de 25 mg L<sup>-1</sup>, estendendo-se até 425 mg L<sup>-1</sup>. Já as curvas de ácido cafeico e ácido salicílico tiveram as concentrações variando de 50 mg L<sup>-1</sup> a 800 mg L<sup>-1</sup>.

Aos dados obtidos foi aplicado o teste de Grubbs para identificação e exclusão de valores atípicos (*outliers*). Em seguida, realizou-se análise de variância (ANOVA) para definição da faixa de linearidade, considerando-se os pontos que originaram modelos matemáticos com poder de predição aceitável e falta de ajuste adequada. Para que o modelo fosse considerado válido, o valor de F da regressão deveria ser superior ao F crítico correspondente, enquanto o F da falta de ajuste deveria ser inferior ao F crítico.

Adicionalmente, avaliou-se a significância (valor de p), que deve ser inferior a 0,05 para a regressão e superior a esse valor para a falta de ajuste, conforme orientações do Inmetro (DOQ-CGCRE-008).

A linearidade foi avaliada pelo método atualmente aceito pelo IUPAC descrito em Oliveiri (2015).

#### 3.6.4.2 Limite de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados de forma preliminar e com finalidade exploratória, visando subsidiar o desenvolvimento inicial do método analítico, não representando, portanto, a etapa definitiva de validação. Os valores foram calculados segundo as equações (1) e (2), respectivamente:

$$LD = \frac{3 * StE}{a} \quad (1)$$

$$LQ = 3,3 * LD \quad (2)$$

Onde ‘StE’ corresponde ao erro padrão da curva de calibração, obtido via ANOVA com 95% de confiança, e  $a$  representa o coeficiente angular da reta de calibração. O LQ foi estabelecido como 3,3 vezes o LD, de acordo com as diretrizes do Inmetro (DOQ-CGCRE-008).

### 3.7 Estudo de propriedades biológicas

#### 3.7.1 Amostras avaliadas nos ensaios biológicos

Os ensaios biológicos foram conduzidos de forma sistemática, abrangendo diferentes tipos de amostras — extratos brutos, frações particionadas e substâncias isoladas — provenientes de *Senega trichosperma* e *Senega pulchella*.

Em um primeiro conjunto de análises, os extratos brutos e frações particionadas de *S. trichosperma* e *S. pulchella* foram avaliados quanto aos teores de fenólicos e flavonoides totais, bem como quanto à atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Além disso, foram realizados os ensaios de letalidade frente a *Artemia salina* e de atividade antimicrobiana, permitindo uma avaliação inicial do potencial biológico dessas amostras.

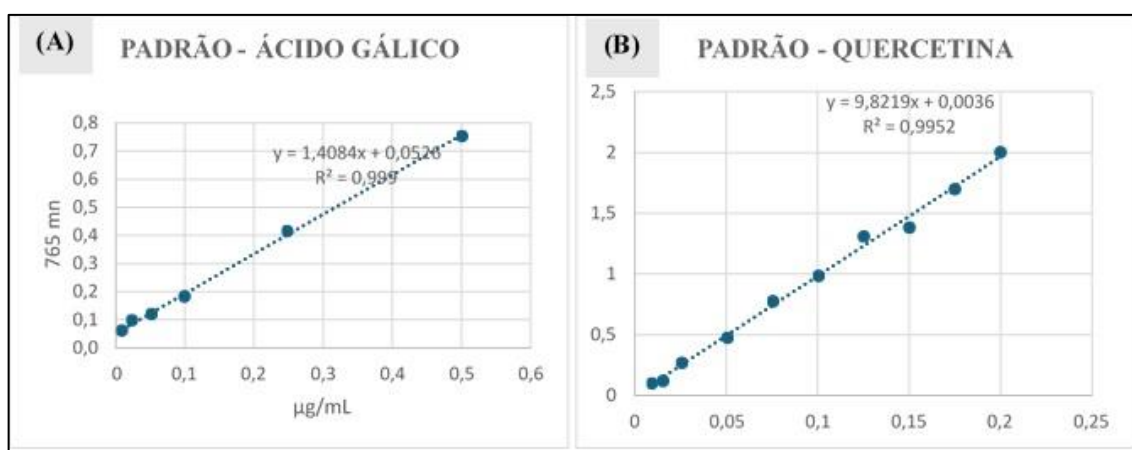
No segundo conjunto, foram analisados os extratos brutos de *S. pulchella* obtidos por diferentes métodos de extração (maceração, ultrassom e Soxhlet) e solventes extratores (metanol ou etanol) — designados como SPMM, SPME, SPSOX e SPULT. Para essas amostras, foram determinados os teores de fenólicos e flavonoides totais, bem como avaliadas as atividades antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP, antimicrobiana, anticolinesterásica *in vitro* e citotóxica.

Por fim, as substâncias isoladas — Substância **2** (STFH-B5), Substância **3** (STFC-C2) e Substância **4** (SPFC-C) — foram submetidas a ensaios de atividade antimicrobiana, atividade anticolinesterásica, tanto *in vitro* quanto *in silico* (acoplamento molecular), e atividade antileishmania, a fim de investigar o potencial farmacológico individual dos metabólitos purificados.

#### 3.7.2 Determinação do conteúdo de Fenólicos e Flavonoides totais

A determinação dos teores de fenólicos totais dos extratos brutos e partições (hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidroalcoólica) seguiu a metodologia desenvolvida por Ainsworth et al. (2007), em que foram preparadas soluções aquosas do reagente Folin Ciocalteu 10% (V/V) e de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  700 mmol/L (7,5% V/V). Para o padrão, foi preparada uma solução metanólica de ácido gálico nas concentrações variando entre 0,01 a 0,30 mg/mL. As soluções dos extratos e frações foram preparadas na concentração de 1 mg/mL. Na sequência, 100  $\mu\text{L}$  das amostras ou das diferentes concentrações de ácido gálico foram transferidas para tubos eppendorf, nos quais foram adicionados também 200  $\mu\text{L}$  da solução de Folin Ciocalteu e, em seguida, homogeneizadas em agitador vórtex.

Após o intervalo de 3 minutos, foram adicionados 800  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 700 mmol/L em cada tubo, que foram incubados em local escuro à temperatura ambiente, por 2 horas. Após o período de incubação, 200  $\mu\text{L}$  das amostras, do padrão e do branco foram transferidos para uma microplaca de 96 poços, e a leitura realizada em espectrofotômetro, a 765 nm. Cabe salientar que todo o procedimento foi realizado em triplicata. A concentração de fenólicos foi determinada por meio de uma curva de calibração feita com soluções padrão de ácido gálico ( $y = 1,4084x + 0,0526$ ;  $R^2 = 0,999$ ) e os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico por grama de amostra, sendo reportados como  $\text{mg GAE} \cdot \text{g}^{-1}$ , (Figura 12).



**Figura 12.** Curvas analíticas obtidas para a quantificação de fenólicos totais e flavonoides. (A) Curva padrão de ácido gálico (765 nm) para determinação de fenólicos totais. (B) Curva padrão de quercetina (430 nm) para determinação de flavonoides totais

Fonte: Elaboração própria

A determinação de flavonoides nos extratos brutos e frações (hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidroalcoólica) foi realizada em microplacas de 96 poços, seguindo o método colorimétrico com cloreto de alumínio, descrito por Sari et al. (2023). Trata-se de um método

que se baseia na complexação do cátion alumínio ( $\text{Al}^{+3}$ ) com as moléculas de flavonoides presentes na amostra, formando um complexo estável de coloração amarela, cuja intensidade é proporcional à concentração de flavonoides na amostra (Peixoto Sobrinho et al., 2010).

Para a análise, foram preparadas soluções de  $\text{AlCl}_3$  a 10%,  $\text{CH}_3\text{COONa}$   $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  e soluções metanólicas das amostras a  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . O padrão de quercetina foi preparado em diferentes concentrações, variando de 0,025 a  $0,175 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , para construção da curva analítica. Em cada poço da microplaca foram adicionados  $50 \mu\text{L}$  da amostra ou da solução padrão,  $100 \mu\text{L}$  de metanol e  $20 \mu\text{L}$  da solução de  $\text{AlCl}_3$  a 10%. A mistura foi homogeneizada suavemente diretamente na microplaca, realizando-se cinco movimentos alternados (verticais e horizontais), e em seguida incubada em ambiente escuro por 3 minutos. Após esse período, foram adicionados  $20 \mu\text{L}$  de  $\text{CH}_3\text{COONa}$   $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $60 \mu\text{L}$  de metanol. Como controle branco, utilizou-se  $20 \mu\text{L}$  de metanol em substituição ao acetato de sódio. A mistura foi então mantida em repouso, protegida da luz, por 40 minutos à temperatura ambiente, para que a reação se completasse.

A leitura foi realizada em uma leitora de microplacas, com a absorbância em 420 nm. Para a curva padrão foi utilizada a solução de quercetina e a equação resultante da reta foi utilizada para calcular as concentrações das amostras experimentais. Os resultados do teor de flavonoides foram expressos como equivalentes de quercetina usando a equação  $y = 9,8219 x + 0,0036$  (Figura 12), com um coeficiente de determinação  $R^2 = 0.9952$ , e foram expressos em equivalentes de quercetina por grama de amostra, sendo reportados como  $\text{mg QE}\cdot\text{g}^{-1}$ . Os testes foram realizados em triplicata.

### 3.7.3 Avaliação da Atividade Antioxidante

#### 3.7.3.1 Determinação da ação sequestradora do radical livre DPPH

As análises de atividades antioxidantes foram realizadas a partir de testes de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de acordo com a metodologia desenvolvida por Malterud et al. (1993), em que foram preparadas soluções metanólicas de DPPH a  $0,042 \text{ mg/mL}$  e do controle positivo Propilgalato, na concentração de  $5 \text{ mg/mL}$ . Para as amostras foram preparadas soluções metanólicas dos extratos brutos e frações de *S. trichosperma* e *S. pulchella* (hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidroalcolica) que variaram de  $0,1$  a  $25 \text{ mg/mL}$ . Cabe destacar que as concentrações avaliadas nas análises foram:

i) 0,1mg/mL; ii) 0,5 mg/mL; iii) 1 mg/mL; iv) 2,5 mg/mL; v) 5 mg/mL; vi) 10 mg/mL; vii) 25 mg/mL.

Foram adicionados a uma microplaca 250µL da solução de DPPH em cada poço utilizado para as análises, que foram realizadas em triplicata, e adicionados 4,2 µL da solução do controle positivo da amostra e do branco (metanol). A microplaca foi mantida em local escuro à temperatura ambiente por 15 minutos e, em seguida, a absorvância foi medida novamente a 517 nm. A porcentagem de sequestro de radicais livres foi calculada com base na equação: %SRL=100×[C-A/C], na qual C corresponde à absorvância do controle e A à absorvância da amostra.

As amostras que atingiram a porcentagem de atividade acima de 50% foram submetidas ao cálculo da concentração eficiente para obter um efeito antioxidante de 50%, ou seja, concentração necessária para reduzir o DPPH em 50% (CE<sub>50</sub>). Para o cálculo foram utilizadas as concentrações testadas na análise dos extratos e frações. Por meio da equação da reta foi possível obter a CE<sub>50</sub>, cujo resultado foi expresso em µg mL<sup>-1</sup>.

### 3.7.3.2 Determinação da atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico

O método de atividade antioxidante do β-caroteno testado no extrato bruto e frações de *S. trichosperma* e *S. pulchella* (hexânico, clorofórmico, acetato de etila e hidroalcolico) foi realizado conforme metodologia desenvolvida por Marco (1968), simplificada por Miller (1971) e adaptado para microplaca por Koleva et al. (2002), que considera que a mistura reativa deva ser preparada através da de uma solução clorofórmica de β-caroteno a 0,2 mg/mL.

As amostras dos extratos e frações foram preparadas em metanol com concentrações de 1–10,0 mg/mL. As concentrações avaliadas nas análises foram: i) 1,0 mg/mL; ii) 2,5 mg/mL; iii) 5 mg/mL; iv) 7,5 mg/mL; v) 10,0 mg/mL. Foram adicionados à microplaca 250 µL da mistura reativa β-caroteno/ácido linoleico, 30 µL de metanol (controle negativo), de quercetina (controle positivo) e dos extratos e frações. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

As microplacas foram incubadas a 45°C e as leituras ocorreram no espectrofotômetro de microplaca em comprimento de onda de 470 nm, leituras essas realizadas imediatamente após a inserção das soluções na microplaca, e posteriormente de 15 em 15 minutos até que se completasse 1 h e 15 min de análises.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da oxidação e obtidos por meio da equação: %I= 100×[1-A<sub>0</sub>-A<sub>t</sub>/A<sub>00</sub>-A<sub>0t</sub>], em que A<sub>0</sub> e A<sub>t</sub> tratam-se das absorvâncias

obtidas dos poços contendo a amostra nos tempos  $t= 0 \text{ min}$  e no  $t= 60 \text{ min}$ , respectivamente.  $A_{00}$  e  $A_{0t}$  referem-se às absorvâncias obtidas dos poços contendo o branco.

### 3.7.3.3 Determinação da atividade antioxidante através do método ABTS

A avaliação da atividade antioxidante, através do método ABTS, é o procedimento mais utilizado para medir a atividade antioxidante através da captura do radical 2,2-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico ( $\text{ABTS}^+$ ) e foi realizada conforme descrito por Re et al. (1999). Foram preparadas inicialmente as soluções de  $\text{ABTS}^+$  a 7 mmol/L e de persulfato de potássio a 2,6 mmol/L ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), que foram misturadas na proporção 1:1. O cátion radical 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico ( $\text{ABTS}^+$ ) foi produzido pela reação de ABTS e persulfato de potássio 12-16 h antes de sua utilização, permanecendo ao abrigo de luz e temperatura ambiente durante esse período.

Passado esse período de incubação, 1 mL da mistura de  $\text{ABTS}^+$  foi diluído em 50 mL de metanol e medida a absorvância ( $0,7 \pm 0,2$  a 734 nm). Posteriormente, foram adicionados à microplaca 280  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{ABTS}^+$  diluída e 20  $\mu\text{L}$  da amostra (extratos brutos e frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidroalcolica), nas concentrações (250, 350, 500, 650, 800 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ ), ou 20  $\mu\text{L}$  de padrão. Na sequência, a microplaca foi incubada em local escuro, em temperatura ambiente, por 20 minutos. A absorvância foi detectada a 734 nm.

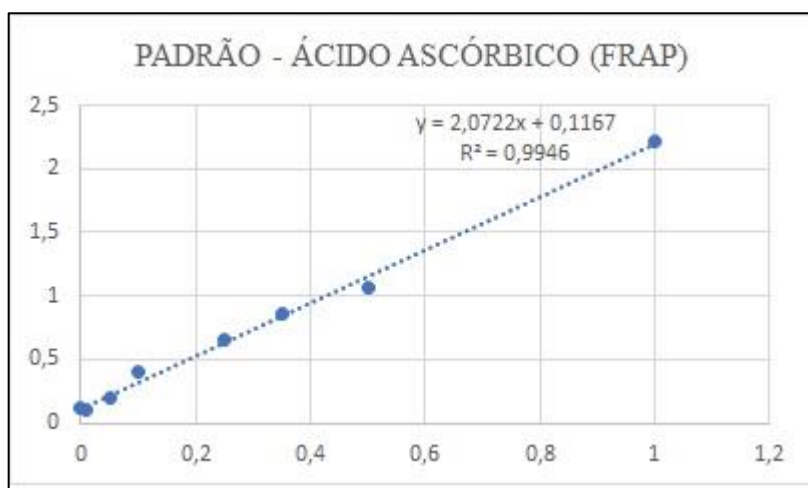
Foi utilizado como controle positivo a solução metanólica do padrão Trolox (0,01 a 0,03 mg/mL). Os resultados foram expressos em  $\text{CE}_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ). Os experimentos foram realizados em triplicata. A equação usada para determinação do percentual de inibição do radical  $\text{ABTS}^+$  foi  $\%I=100 \times [C-A/C]$ , em que C corresponde à absorvância do controle e A à absorvância da amostra.

### 3.7.3.4 Determinação do poder antioxidante por meio da redução do Ferro (FRAP)

As análises da capacidade redutora dos extratos foram realizadas utilizando o ensaio de redução de  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$ , segundo a metodologia de Vijayalakshmi e Ruckmani (2016). Esse método é baseado no princípio do aumento da absorvância das misturas de reação, em que o composto antioxidante presente nas amostras forma um complexo colorido com ferricianeto de potássio, ácido tricloroacético e cloreto férrico. Esse complexo é medido a 700 nm por espectrofotometria UV, de cor amarela variando para verde pálido e azul, dependendo da

concentração de antioxidantes nas amostras. Para o ensaio, as amostras foram preparadas nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,5 mg/mL.

Uma alíquota de 250  $\mu\text{L}$  da solução dos extratos foram diluídos em 625  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato a 0,2M (pH = 6,6) e 625  $\mu\text{L}$  de ferrocianeto de potássio a 1%. A mistura foi agitada com auxílio do vortex e aquecida a 50°C por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 625  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético e o sistema foi submetido a centrifugação a 3000 RPM por 10 minutos. Foram coletados 625  $\mu\text{L}$  do sobrenadante, que foi diluído com 625  $\mu\text{L}$  de água deionizada e 125  $\mu\text{L}$  de cloreto férrico a 0,1%. Alíquotas de 250  $\mu\text{L}$  foram adicionadas a microplaca em triplicata, para leitura em espectrofotômetro. Para o FRAP, utilizou-se a equação  $y = 2,0722x + 0,1167$ , com coeficiente de determinação  $R^2 = 0,9946$  (Figura 13).



**Figura 13.** Curva padrão de ácido ascórbico utilizada no ensaio FRAP para determinação da capacidade antioxidante, expressa em mg de ácido ascórbico equivalente por grama de amostra.

Fonte: Elaboração própria

Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido ascórbico por grama de amostra, sendo reportados como  $\text{mg AA} \cdot \text{g}^{-1}$ , a partir da concentração de 1 mg/mL de cada amostra.

### 3.7.4 Ensaios biológicos

#### 3.7.4.1 Avaliação de letalidade frente a *Artemia salina*

*Artemia salina* Leach é um microcrustáceo que tem um comprimento de 8 a 10 mm e coloração variando entre vermelho claro, rosa ou marrom dourado, o que depende de seu habitat (Leite et al., 2009). É amplamente conhecido como indicador de toxicidade em um bioensaio que utiliza a concentração letal média ( $CL_{50}$ ) como parâmetro de avaliação da atividade

biológica. O procedimento foi realizado conforme metodologia desenvolvida por Michael et al. (1956) e adaptada para extratos de plantas por Meyer et al. (1982), em que inicialmente os ovos dos microcrustáceos foram inseridos em aquário, com todas as condições marinhas simuladas (água salgada, oxigenação via bomba de aquário, locais iluminados e sem iluminação, fermento biológico para alimentação após eclosão dos ovos).

O aquário foi dividido em duas seções com pequenos orifícios para permitir a passagem dos náuplios de *Artemia salina* entre os lados. A parte menor foi revestida com papel alumínio para bloquear a entrada de luz, enquanto a parte maior foi iluminada com uma lâmpada led de 12W. Houve a eclosão dos ovos em um período de 36 horas. As amostras em triplicata dos extratos brutos e das frações (hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidroalcóolica) foram testadas em concentrações de 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 mg/mL em tubos de ensaio.

O ensaio em branco foi realizado apenas com água salina e os microcrustáceos, como mostra a Figura 14. O volume dos tubos, com as amostras e 10 microcrustáceos, foi completado para 5 mL com água salina. Os sobreviventes foram contados após 24 horas e a porcentagem da Letalidade frente à *Artemia salina* (%LAS) das amostras foi determinada pela equação: % LAS =  $[(n^\circ \text{ de mortos da amostra} - n^\circ \text{ de mortos do branco}) / n^\circ \text{ de sobreviventes do branco}] \times 100$ .

Em seguida, a concentração letal média (CL<sub>50</sub>), com intervalos de confiança de 95%, foi calculada utilizando análise Probit. A letalidade pode ser considerada como primeiro indicativo de toxicidade do extrato testado.



**Figura 14.** Sistema de realização do teste de letalidade da *Artemia salina*

Fonte: Elaboração própria

### 3.7.4.2 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Os ensaios referentes a este estudo foram realizados no Laboratório de Pesquisa: Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Departamento de Ciências Farmacêuticas/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal da Paraíba: março/abril 2025.

#### **Produtos testados**

Foram testadas as partições de *Senega trichosperma* e *Senega pulchella*, oriundas do extrato bruto obtido de maceração com metanol em ambas as espécies. As amostras de *S. trichosperma* foram as frações: hexânica (STFH), acetato de etila (STFAC) e hidroalcóolica (STFHID). As frações da *S. pulchella* avaliadas foram: hexânica (SPFH), clorofórmio (SPFC), acetato de etila (SPFAC) e hidroalcóolica (SPFHID). Além das frações, também foram incluídas nas análises as Substâncias **2**, **3** e **4** isoladas. Todas as amostras foram submetidas aos ensaios biológicos para avaliação da atividade antimicrobiana sobre cepas de bactérias, fungos leveduriformes e fungos filamentosos.

Os produtos foram pesados e devidamente solubilizados em 150 µL (3%) de dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionados 100 µL (2%) de Tween 80, completando-se o volume final com água destilada esterilizada q.s.p. 3 mL. Dessa forma, foi obtida a concentração inicial dos produtos de 1024 µg/mL e diluído em série até 32 µg/mL.

Para o controle dos resultados dos ensaios biológicos, foram usadas como padrão as drogas licenciadas: gentamicina para bactérias e fluconazol para fungos filamentosos (Cleeland; Squires, 1991; Nascimento et al., 2007; Pereira et al., 2014).

#### **Microrganismos**

Para os ensaios de atividade biológica dos produtos testes, foram utilizadas as seguintes cepas: *Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853, *Candida albicans* ATCC-76485, *C. albicans* LM-65, *C. tropicalis* ATCC-750, *C. tropicalis* LM- 14, *Tricophyton rubrum* ATCC-28188, *T. rubrum* LM-150, *Aspergillus flavus* ATCC-4603, *A. flavus* LM-248, *Penicillium citrinum* ATCC- 28752, *P. citrinum* LM-74.

Os microrganismos pertencem à Micoteca do Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal

da Paraíba (UFPB). As cepas foram mantidas em BHI/bactérias e em ASD/fungos à temperatura de 4°C. Foram utilizados para os ensaios repiques de 24 - 48 horas em BHI/ASD, respectivamente, para bactérias e leveduras, incubados a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Para fungos filamentosos, o cultivo foi feito em ASD e a incubação foi de 5 a 7 dias à temperatura ambiente ( $28\text{-}30^\circ\text{C}$ ).

### **Meios de cultura**

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliação da atividade biológica foram Brain Heart Infusion Broth (BHI) e caldo RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato (Difco Laboratories Ltd, USA, France e INLAB, São Paulo, Brasil). Os meios foram preparados conforme as descrições dos fabricantes.

### **Inóculo**

Para preparação do inóculo, as colônias obtidas de culturas das cepas de fungos em meio ASD foram suspensas em solução fisiológica a 0,9% estéril e ajustadas de acordo com o tubo 0,5 da escala padrão de Mcfarland, para a obtenção de aproximadamente  $1\text{-}5 \times 10^6$  UFC/mL para as cepas fúngicas e  $1\text{-}5 \times 10^8$  UFC/mL para as cepas bacterianas (Antunes et al., 2006; Cleeland; Squires, 1991; CLSI, 2008; CLSI, 2015; Freire et al., 2014; Hadacek; Greger, 2000).

### **Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados conforme os protocolos de Cleeland e Squires (1991), Eloff (1998) e CLSI (2008), com algumas modificações. A determinação da CIM das amostras frente às cepas fúngicas foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo, com placa para cultura de células (TPP/ SWITZERLAND/EUROPA) contendo 96 poços com fundo em “U”.

Inicialmente, foram distribuídos 100  $\mu\text{L}$  de caldo BHI/bactérias e RPMI/fungos duplamente concentrados nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  dos produtos solubilizados foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. Por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 até 32  $\mu\text{g/mL}$ . Por fim, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  das suspensões das cepas bacterianas e fúngicas nas cavidades, em que cada coluna da placa se refere, especificamente, a uma espécie.

Paralelamente, foram realizados os controles: microrganismos (BHI + bactérias e RPMI + fungos), para comprovação da viabilidade das cepas; meio de cultura (RPMI), para

comprovação da esterilidade e controle com antimicrobianos gentamicina e fluconazol. As placas preparadas foram assepticamente fechadas e submetidas à incubação numa temperatura de  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 - 48 horas para os ensaios com bactérias e leveduras e a temperatura ambiente ( $TA/28-30^\circ\text{C}$ ) para os fungos filamentosos.

A CIM para cada produto foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano e/ou verificada pela permanência da coloração do corante indicador. A atividade antifúngica dos produtos foi interpretada e considerada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: até  $600 \mu\text{g/mL}$ = forte atividade;  $600-1500 \mu\text{g/mL}$ = moderada atividade;  $>$  acima de  $1500 \mu\text{g/mL}$ =fraca atividade ou produto inativo (Holetz et al., 2002; Houghton et al., 2007; Sartoratto et al., 2004).

Após leitura da CIM, foi realizado o ensaio para determinação da CBM/ CFM. Alíquotas de  $10 \mu\text{L}$  do sobrenadante das cavidades em que foi observada completa inibição do crescimento fúngico (CIM, CIMx2 e CIMx4) foram adicionadas a  $100 \mu\text{L}$  de caldo RPMI contidos em novas placas de microdiluição/96 poços e incubadas por 24-48 horas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ /leveduras e TA ( $28-30^\circ\text{C}$ )/5-7dias para fungos filamentosos. A CBM e a CFM foram consideradas as menores concentrações do produto teste capazes de inibir o crescimento dos microrganismos.

Os ensaios foram realizados em triplicata, e o resultado expresso pela média aritmética das CFM's obtidas nos três ensaios (Balouiri; Sadiki; Ibsouda, 2016; Ncube; Afolayan; Okoh, 2008). Paralelamente, foi realizado o controle de esterilidade (caldo RPMI 1640) e de viabilidade das espécies bacterianas e fúngicas (RPMI 1640 mais inóculo de cada micro-organismo).

#### 3.7.4.3 Avaliação da Atividade Anticolinesterásica (*in vitro* e *in silico*)

A avaliação da atividade anticolinesterásica foi realizada seguindo a metodologia descrita por Ellman et al. (1961), adaptado para microplacas de 96 poços, utilizando parâmetros cinéticos previamente determinados por Almeida et al. (2023).

Para realização dos testes foram utilizadas as enzimas acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* tipo IV e butirilcolinesterase obtida de soro equino; também foi utilizado o reagente de Ellman (ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico – DTNB), albumina de soro bovino (ASB), acetiltiocolina (ACTI).

Para os ensaios de acetilcolinesterase (AChE), em cada poço foram adicionados  $140 \mu\text{L}$  de tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$  em pH 7,4 contendo ASB  $0,1\%$ ,  $20 \mu\text{L}$  da amostra diluída em etanol,

20 µL de solução enzimática a 0,15 U/mL, 10 µL de 0,01 M DTNB e 10 µL de ACT 0,125 mM. Para os ensaios de butirilcolinesterase (BuChE), por sua vez, foram adicionados 20 µL da solução enzimática a 0,50 U/mL e 10 µL de ACTI 0,744 mM aos demais compostos reacionais. Os extratos brutos foram testados em uma solução a 5 mg/mL. As Substâncias **2** e **3** foram avaliadas quanto à atividade anticolinesterásica frente às enzimas AChE e BuChE, em uma faixa de concentrações de 7,81 a 1000 µM,

O etanol foi utilizado como diluente e controle negativo, enquanto a eserina (10 µM) foi utilizada como inibidor padrão (controle positivo) em ambos os ensaios. Os testes foram realizados em triplicata, as leituras ocorreram no espectrofotômetro de microplaca e a absorbância foi medida a 405 nm em ciclos de 10 minutos para AChE e 20 minutos para BuChE.

O método consiste em determinar a atividade anticolinesterásica através da mensuração da taxa de produção de tiocolina à medida que a acetiltiocolina é hidrolisada pela acetilcolinesterase, ou butiriltiocolina quando hidrolisada pela butirilcolinesterase. Isso se deve ao fato de que a enzima hidrolisa o substrato acetiltiocolina, gerando como produto a tiocolina que, por sua vez, reage com o reagente de Ellman, produzindo 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina e 5-tio-2-nitrobenzoato, que podem ser detectados no comprimento de onda estudado (Castro, 2016).

A porcentagem de inibição da AChE foi determinada comparando-se as absorbâncias das amostras em relação ao branco, conforme a equação descrita por Alves (2012):  $\%IChE = \frac{(\Delta Ab - \Delta Ai)}{\Delta Ab} \times 100$ , em que %IChE corresponde à porcentagem de inibição da AChE,  $\Delta Ab$  representa a diferença de absorbância do branco entre o tempo inicial e 10 minutos, e  $\Delta Ai$  corresponde à diferença de absorbância do inibidor (padrão ou amostra) no mesmo intervalo de tempo. Os valores obtidos de %IChE foram então utilizados para a determinação da concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ), calculada por ajuste de curva dose-resposta sigmoideal no software GraphPad Prism (versão 8).

As substâncias **2** e **3** foram submetidas a análises de acoplamento molecular frente a estrutura 3D de acetilcolinesterase (AChE; PDB ID: 4M0E) e butirilcolinesterase (BuChE; PDB ID: 4BDS). As estruturas cristalográficas foram preparadas no módulo *Biopolymer* disponível no programa SYBYL-X 2.0, com remoção de íons e moléculas de água, adição de hidrogênios e ajuste do estado de protonação pelo servidor ProKa (pH 7,4). As simulações foram conduzidas com o programa AutoDock Vina 1.1.2 (Trott & Olson, 2009), através de parâmetros previamente validados (Mascarenhas et al., 2020), com RMSD e AUC dentro dos limites aceitáveis ( $RMSD_{AChE} = 1,97 \text{ \AA}$ ;  $AUC_{AChE} = 1,97 \text{ \AA}/0,88$ ;  $RMSD_{BuChE} = 1,77 \text{ \AA}$  /

$AUC_{BuChE} = 1,77 \text{ \AA}/0,86$ ). As caixas de acoplamento foram definidas conforme as coordenadas experimentais de cada ligante cristalográfico.

#### 3.7.4.4 Avaliação da Atividade Citotóxica

Foram utilizadas quatro linhagens celulares para a avaliação da atividade citotóxica dos extratos vegetais. As linhagens tumorais escolhidas foram K562, derivada de uma leucemia mieloide crônica humana, e PC3, proveniente de adenocarcinoma de próstata humana, amplamente empregadas como modelos para triagem de compostos com potencial antineoplásico.

Como modelos não tumorais, utilizaram-se as linhagens HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), de origem endotelial humana, representando células normais do sistema vascular, e McCoy, linhagem de fibroblastos derivada de tecido conjuntivo, comumente empregada como controle para avaliação de toxicidade basal. As células K562 e PC3 foram cultivadas em meio RPMI e as células HUVEC e McCoy em meio DMEM-F12, todas suplementadas com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina. As células foram mantidas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Para a avaliação da citotoxicidade, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços; após 24h, os tratamentos foram adicionados, seguindo a metodologia proposta por O'Brien, J., et al., 2000. Os tratamentos utilizados consistiram em extratos brutos de *Senega pulchella*, obtidos pelos métodos de extração por maceração em metanol (MM), maceração em etanol (ME), soxhlet (SOX) e ultrassom (ULT). As concentrações dos extratos variaram de 0 a 1000 µg/mL. Após a adição dos tratamentos, as células permaneceram incubadas por 48h. Ao final da incubação, foi adicionado o reagente de resazurina em cada poço, seguido de incubação por mais 1 hora a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

A resazurina é um corante redox que, na presença de células viáveis metabolicamente ativas, é reduzida a resorufina, adquirindo coloração rosa, enquanto a resazurina não reduzida permanece azul. A viabilidade celular foi determinada por meio da leitura da absorbância em leitor de microplacas, utilizando dois comprimentos de onda: 570 nm e 600 nm. A diferença entre essas leituras reflete a quantidade de resorufina formada, que é proporcional à atividade metabólica das células.

Os resultados foram expressos em percentual de viabilidade em relação ao controle negativo (células não tratadas), sendo utilizados para determinar a concentração inibitória para

50% das células ( $CI_{50}$ ), que foi calculada por meio de ajuste de curva dose-resposta sigmoideal, utilizando o *software* GraphPad Prism (versão 8).

Para avaliar a seletividade dos extratos em células tumorais, utilizou-se o cálculo do índice de seletividade (IS) que é uma métrica crucial na avaliação da atividade citotóxica de compostos, uma vez que compara a toxicidade em células tumorais e células não tumorais. O IS é calculado pela razão entre o  $CI_{50}$  em células normais e o  $CI_{50}$  em células tumorais.

#### 3.7.4.5 Avaliação da Atividade *Antileishmania*

A enzima superóxido dismutase B2 de *Leishmania braziliensis* (LbSODB2) foi previamente clonada, expressa, purificada e gentilmente cedida por Brito et al. (2018). As substâncias STFH-B5 (Substância 2), STFC-C2 (Substância 3) de *S. trichosperma* e SPFC (Substância 4) de *S. pulchella* foram avaliadas quanto ao efeito dos compostos na estabilidade térmica de LbSODB2 em 10 concentrações diferentes (400  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ M, 6,25  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 1,5  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, diluídos em DMSO); um volume equivalente de DMSO (5% v/v) foi utilizado como controle negativo.

Para tal, 5  $\mu$ M de LbSODB2 foram diluídos em uma mistura de tampão PBS (pH 7,0) e SYPRO Orange® (diluição 1:100, 5% v/v) por poço, completando os 20  $\mu$ L de cada poço reacional. O sistema foi montado em uma placa transparente de 96 poços (Loccus®) e selada com strip-caps planos (Greiner Bio-One®). A placa foi então lida em um protocolo de curva de derretimento variando de 25 a 85°C em incrementos de 1 °C por 30 segundos em um sistema BioRad® CFX 96 Touch Real-Time PCR. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e os valores expressos em média e desvio padrão.

#### 3.7.5 Análise estatística

Para o cálculo dos valores de  $CE_{50}$  nos ensaios de sequestro dos radicais livres DPPH e ABTS, aplicou-se regressão linear no *software* Microsoft® Excel® 2019, considerando coeficientes de correlação  $r \geq 0,99$  como indicativo de bom ajuste do modelo. A análise de variância (ANOVA) foi empregada para comparação dos rendimentos dos extratos, teores de compostos bioativos e resultados das atividades biológicas, sendo as médias discriminadas pelos testes de Tukey ou Scott-Knott a 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ), com o auxílio do programa SISVAR®, versão 5.8 (2019).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Obtenção de extratos e frações

#### 4.1.1 Rendimento dos extratos

Os rendimentos de extração obtidos para *S. pulchella* (Tabela 6) apresentaram variações entre os métodos de extração empregados, evidenciando a influência das condições operacionais (tempo, temperatura e dinâmica de solvente) e do tipo de solvente na eficiência de recuperação dos constituintes vegetais. Entre os métodos avaliados, a extração por Soxhlet utilizando metanol apresentou o maior rendimento (27%), seguida pela maceração metanólica (20,9%) e pela extração assistida por ultrassom (ULT) em metanol (19,1%). O menor rendimento foi observado para a maceração etanólica (10,8%).

**Tabela 6.** Rendimento dos extratos brutos obtidos através de diferentes métodos de extração de *S. pulchella*

MÉTODO DE EXTRAÇÃO	*RENDIMENTO (%)
Maceração Metanólica	20,9
Maceração Etanólica	10,8
Ultrassom - metanol	19,1**
Soxhlet - metanol	27,0

Fonte: Elaboração própria

\* Trata-se do valor médio obtido pela análise em triplicata.

As diferenças observadas entre os rendimentos obtidos com metanol e etanol podem estar associadas às propriedades físico-químicas desses solventes. O metanol apresenta maior polaridade, além de menor viscosidade, o que favorece sua penetração na matriz vegetal e a formação de ligações de hidrogênio com metabólitos polares e moderadamente polares, resultando em maior difusão e solubilização (Azwanida, 2015; Rostagno & Prado, 2022).

Entre os métodos empregados, o Soxhlet destacou-se por fornecer rendimentos mais elevados em comparação às técnicas realizadas à temperatura ambiente. Esse desempenho está relacionado à renovação contínua do solvente aquecido, que mantém um gradiente de concentração favorável entre o solvente e a matriz, intensificando a transferência de massa e retardando o estabelecimento do equilíbrio. O aquecimento também contribui para aumentar a solubilidade dos constituintes e acelerar a difusão, resultando em maior eficiência do processo extrativo (Ponphaiboon et al., 2023; Vinita et al., 2025).

A técnica de extração assistida por ultrassom apresentou rendimento próximo ao da maceração metanólica, mesmo empregando tempo de extração muito inferior (30 minutos, contra 48 horas com 5 repetições), o que demonstra sua eficiência e potencial para reduzir significativamente o tempo de processamento. O efeito cavitacional gerado pelas ondas ultrassônicas provoca microjatos e microturbulências que facilitam a desagregação da matriz e a liberação de metabólitos (Chemat et al., 2017). Apesar de alguns relatos sugerirem possível degradação de substâncias sensíveis pela cavitação intensa (Zhang et al., 2021), neste caso os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD não indicaram perda ou modificação significativa de constituintes, sugerindo que a técnica manteve a integridade química dos extratos analisados.

Em síntese, os resultados indicam que o rendimento de extração pode estar condicionado tanto a parâmetros operacionais (tipo de solvente, temperatura, tempo e agitação), como também às características intrínsecas da espécie vegetal, devendo os parâmetros operacionais serem considerados na escolha do método para maximizar a recuperação dos compostos de interesse.

#### 4.1.2 Partição líquido-líquido

A comparação entre *S. trichosperma* e *S. pulchella* (Tabela 7) evidenciou diferenças quantitativas nos rendimentos tanto dos extratos brutos quanto das frações obtidas por partição líquido-líquido. Embora ambas tenham sido submetidas às mesmas condições de maceração metanólica, *S. trichosperma* apresentou rendimento bruto superior (48%) em relação a *S. pulchella* (41%), sugerindo diferenças intrínsecas associadas à composição química e à estrutura da matriz vegetal.

**Tabela 7.** Rendimento do extrato bruto e partições obtidos de *S. trichosperma*, *S. pulchella*

	<i>S. trichosperma</i>	<i>S. pulchella</i>
Extrato Bruto	48%	41%
Fração Hexânica	10,8%	6,2%
Fração Clorofórmica	3,7%	1,6%
Fração Acetato de Etila	0,9%	0,6%

Fonte: Elaboração própria

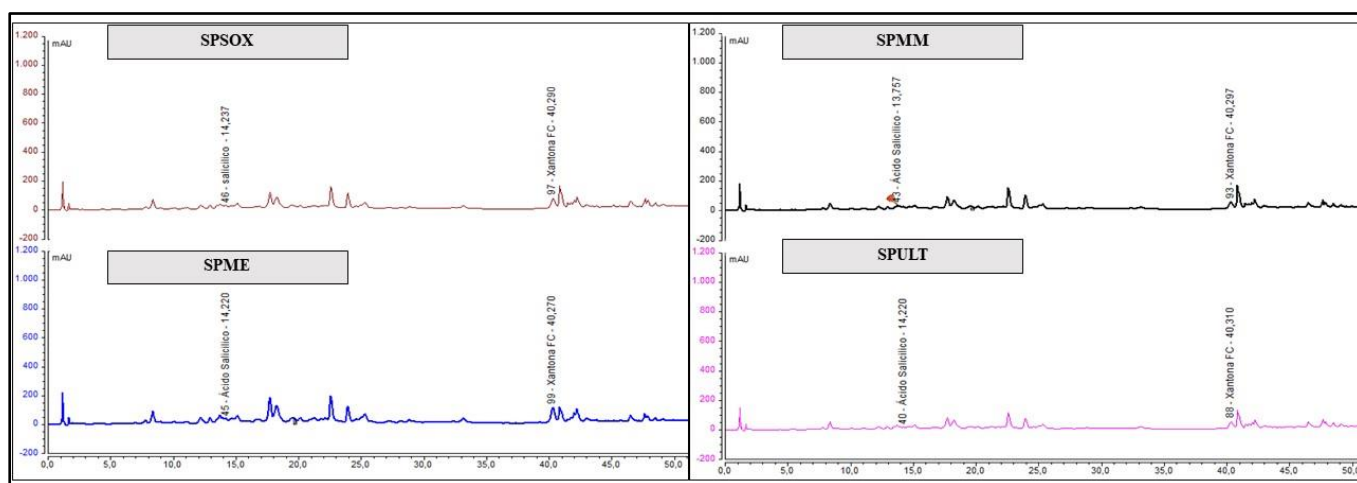
\*O rendimento do extrato e a frações foram calculados em função da massa de material vegetal seco.

A distribuição dos rendimentos entre as frações também refletiu perfis químicos distintos entre as espécies. Todas as frações de *S. trichosperma* apresentaram rendimentos mais elevados do que as correspondentes de *S. pulchella*. A fração hexânica, por exemplo,

representou 10,8% do extrato da primeira, contra 6,2% da segunda, indicando um maior teor relativo de constituintes apolares em *S. trichosperma*. Tendência semelhante foi observada nas frações clorofórmica (3,7% vs. 1,6%) e acetato de etila (0,9% vs. 0,6%), associadas geralmente a metabólitos de polaridade intermediária ou moderadamente polar.

## 4.2 Análise do perfil químico por CLAE-DAD

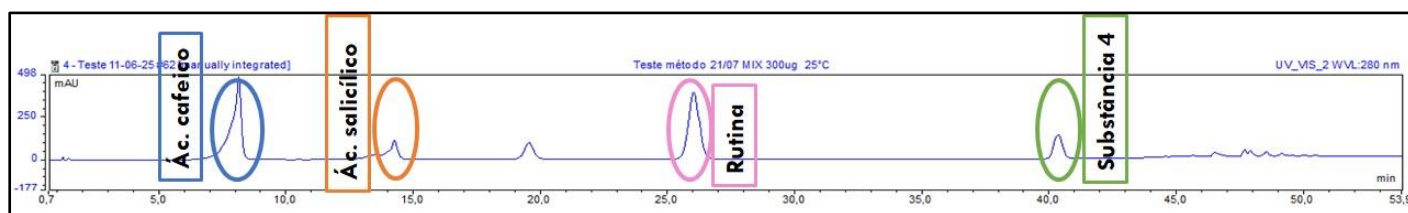
Os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD para os extratos brutos de *Senega pulchella*, preparados por maceração em metanol (SPMM), maceração em etanol (SPME), Soxhlet com metanol (SPSOX) e ultrassom com metanol (SPULT), evidenciaram perfis químicos qualitativamente semelhantes, com a maioria dos picos presente em todas as amostras e manutenção da resolução cromatográfica (Figura 15). A detecção a 280 nm favoreceu a visualização de compostos aromáticos, como ácidos fenólicos, flavonoides e xantonas, classes largamente descritas no gênero *Senega*.



**Figura 15.** Cromatograma dos padrões identificados nas amostras de extratos brutos de *S. pulchella*, obtidos a partir da extração por Maceração Metanólica (SPMM), Maceração Etanólica (SPME), Soxhlet (SPSOX) e Ultrassom (SPULT)

Fonte: Elaboração própria

A injeção do mix de padrões (Figura 16) possibilitou a identificação de picos correspondentes ao ácido cafeico (TR  $\approx$  6–9 min), ácido salicílico (TR  $\approx$  13–15 min), rutina (TR  $\approx$  25–28 min) e uma substância isolada da fração clorofórmica de *S. pulchella* – Substância **4** (TR  $\approx$  39–41 min). Entre estes, o ácido salicílico e a Substância **4** foram detectados em todas as amostras, embora com intensidades variáveis, permitindo sua quantificação comparativa entre os métodos de extração (Tabela 8).



**Figura 16.** Cromatograma do mix padrões testados na concentração de 300 µg/mL  
Fonte: Elaboração própria

**Tabela 8.** Áreas dos picos e concentrações correspondentes ao ácido salicílico e a Substância 4, identificados por CLAE-DAD nos extratos brutos de *Senega pulchella*

AMOSTRA	ÁREA ÁCIDO SALICÍLICO (mAu.min)	CONCENTRAÇÃO ÁC. SALICÍLICO (mg.L <sup>-1</sup> )	ÁREA SUBSTÂNCIA 4 (mAu.min)	CONCENTRAÇÃO SUBSTÂNCIA 4 (mg.L <sup>-1</sup> )
SPMM	13,66±0,94	38,33 ± 5,52 <sup>a2</sup>	30,49±3,11	31,82±3,41 <sup>a1</sup>
SPME	19,33±1,38	74,62 ± 8,35 <sup>a3</sup>	43,34±3,34	46,78±3,66 <sup>a2</sup>
SPSOX	10,67±0,87	21,73 ± 5,07 <sup>a1</sup>	20,98±2,65	22,13±2,91 <sup>a1</sup>
SPULT	10,53±0,72	21,79 ± 4,36 <sup>a1</sup>	22,60±5,52	22,23±5,74 <sup>a1</sup>

Fonte: Elaboração própria

\* Os valores são apresentados como média ± desvio padrão de três repetições independentes (N = 3). As análises de variância (ANOVA) foram realizadas separadamente para cada composto (padrão 1 = ácido salicílico; padrão 2 = substância 4), seguidas do teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias seguidas pela mesma letra minúscula e mesmo número em uma coluna não diferem estatisticamente entre si. As comparações não foram realizadas entre os dois compostos, mas apenas entre os métodos de extração dentro de cada variável analisada.

\*\* As concentrações foram calculadas a partir das equações de regressão obtidas nas curvas analíticas correspondentes (ver pág. 68).

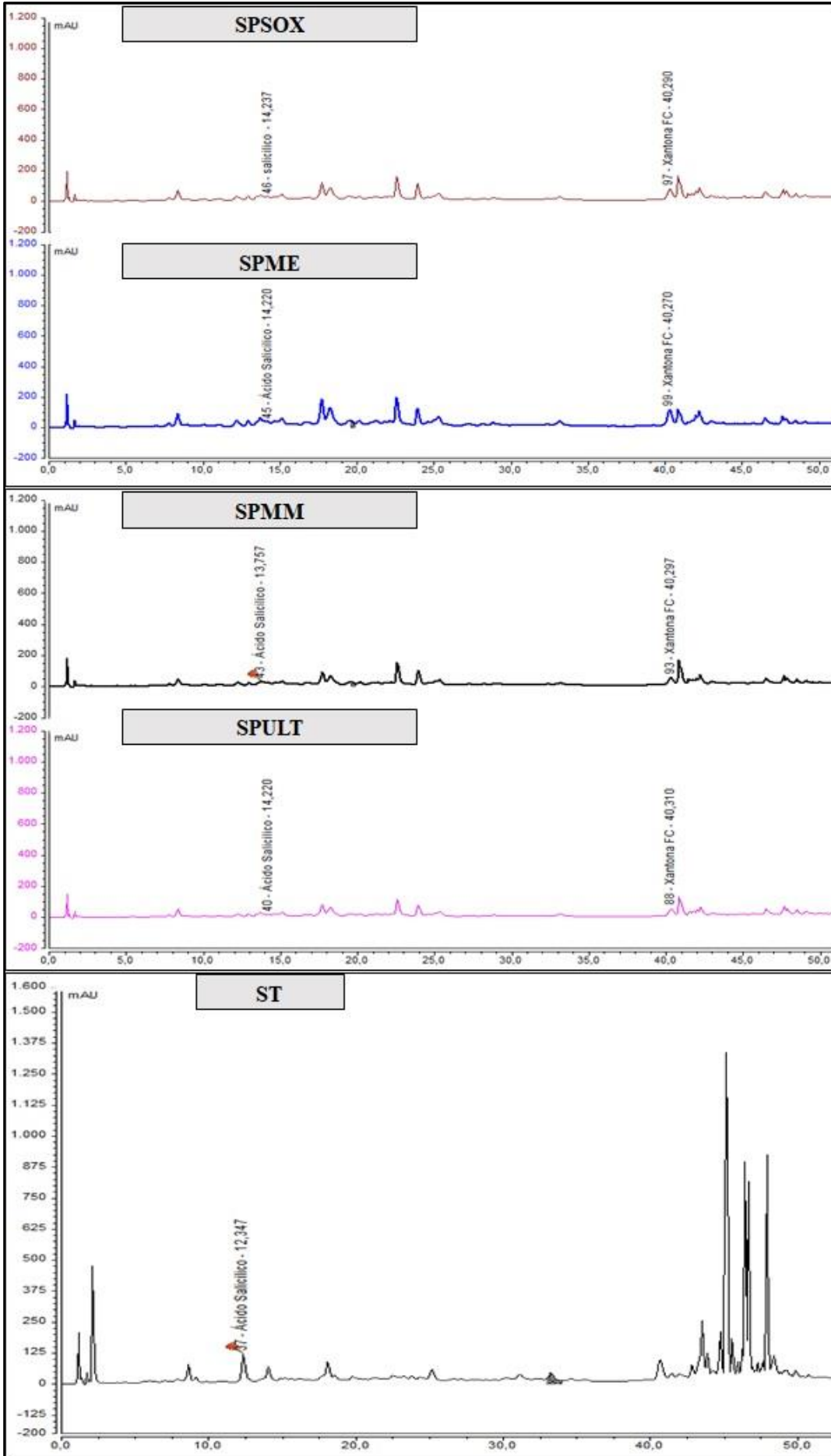
\*\*\* SPMM (maceração metanólica), SPME (maceração etanólica), SPSOX (Soxhlet com metanol) e SPULT (ultrassom com metanol).

A comparação estatística dos métodos de extração revelou diferenças significativas na eficiência de recuperação dos compostos analisados (Tabela 8). Para ambos os padrões avaliados — ácido salicílico (padrão 1) e substância 4 (padrão 2) —, as análises de variância (ANOVA) indicaram efeito significativo dos tratamentos ( $p < 0,05$ ), confirmando que os métodos de extração empregados influenciaram diretamente as concentrações obtidas a partir das análises por CLAE-DAD. O teste de Tukey evidenciou que o método SPME (maceração etanólica) apresentou os maiores valores médios de concentração para os dois compostos, diferindo estatisticamente dos demais métodos em ambos os casos. Para o ácido salicílico, o agrupamento estatístico foi formado em três níveis distintos (a1, a2, a3), com SPME significativamente superior (74,62 mg L<sup>-1</sup>), seguido por SPMM (38,33 mg L<sup>-1</sup>) e, por último, SPSOX e SPULT (~21,8 mg L<sup>-1</sup>), que não diferiram entre si. Já para a substância 4, os agrupamentos foram reduzidos a dois (a1 e a2): SPME manteve-se como método mais eficiente

(46,78 mg L<sup>-1</sup>), enquanto SPMM, SPSOX e SPULT não apresentaram diferenças significativas entre si (22–32 mg L<sup>-1</sup>).

Esses resultados indicam um padrão consistente de extração, no qual o etanol (SPME) foi o solvente mais eficiente para a extração simultânea de compostos fenólicos e xantonas, apresentando as maiores concentrações para ambos os marcadores, enquanto que a extração por Soxhlet e assistida por ultrassom (SPSOX e SPULT), usando metanol como solvente extrator, apresentam desempenho inferior e maior variabilidade. O comportamento intermediário de SPMM, observado em ambas as análises, sugere que a maceração metanólica, embora eficiente, é menos seletiva em comparação à maceração etanólica. Apesar do tempo reduzido de extração em comparação aos demais métodos, a extração assistida por ultrassom (SPULT) foi capaz de recuperar quantidades detectáveis dos dois marcadores avaliados, sem sinais de degradação — aspecto indicado pela manutenção dos tempos de retenção e do formato dos picos, sem alargamentos ou desaparecimento de sinais cromatográficos. Embora as áreas obtidas para SPULT sejam menores, esse resultado pode estar mais relacionado à menor intensidade do processo (tempo e número de ciclos aplicados) do que às perdas químicas. Assim, mesmo em condições menos intensivas, a SPULT demonstrou bom desempenho na recuperação de compostos fenólicos e xantonas, destacando-se como uma técnica rápida e eficiente.

A comparação dos perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD para *Senega trichosperma* (ST) e *S. pulchella* (SP) (Figura 17) evidencia diferenças marcantes na distribuição dos picos ao longo do gradiente. Nos primeiros 10 minutos, ST apresenta maior número e intensidade de sinais, sugerindo uma maior diversidade de metabólitos altamente polares em relação a SP. Entre 10 e 30 minutos, observa-se um perfil mais complexo para SP, caracterizado por maior densidade de picos intermediários. Já na região de 40 a 55 minutos, SP se destaca pela presença de um pico intenso correspondente à Substância 4, enquanto ST exibe uma “cauda” cromatográfica composta por múltiplos picos bem resolvidos após a eluição da xantona (TR > 40 min), o que indica a ocorrência de uma mistura relativamente complexa de constituintes de baixa polaridade.



**Figura 17.** Perfis cromatográficos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD,  $\lambda = 280$  nm) dos extratos brutos de *Senega trichosperma* (ST) e *Senega pulchella* obtidos por diferentes métodos de extração: SPMM, SPME, SPSOX e SPULT

Fonte: Elaboração própria

Além dos marcadores identificados, diversos picos majoritários não caracterizados foram detectados entre 10 e 30 minutos em ambas as espécies. Estudos de *fingerprint* cromatográfico com outras espécies do gênero, como *S. tenuifolia*, *S. sibirica*, *S. japonica*, *S. fallax*, *S. arvensis* e *S. glomerata*, indicam que essa faixa de eluição corresponde frequentemente a ésteres de oligossacarídeos, saponinas e xantonas. Tais compostos são relatados como abundantes em raízes de *Senega* e estão associados a atividades biológicas importantes, incluindo efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e citotóxicos (Jing et al., 2024).

Essas observações corroboram os achados de Silva (2015) para *P. boliviensis*, em que fenólicos comerciais (rutina, ácido gálico, poligaleno e aurapteno) foram detectados nas mesmas faixas descritas por Rocha (2012), juntamente com salicilatos — especialmente salicilato de metila — característicos da família Polygalaceae. Lopes (2022) também relatou um perfil cromatográfico bem definido para fenólicos em espécies do gênero, incluindo flavonoides (rutina), cumarinas (escopoletina e febalosina), xantonas e estirilpironas.

No caso de *S. pulchella*, a análise por CLAE-DAD confirmou a presença de dois metabólitos majoritários: ácido salicílico e Substância **4**, ambos previamente descritos como bioativos em espécies de *Senega*.

#### 4.2.1 Quantificação

##### 4.2.1.1 Curva analítica

Com base nas áreas dos picos das soluções nos diferentes níveis de concentração da curva analítica do ácido cafeico, ácido salicílico, rutina e substância **4**, obtidas por cromatografia CLAE-DAD, foi realizado o teste de Grubbs para identificação de possíveis *outliers*. Os dados gerais usados na curva de calibração e os resultados do teste de Grubbs estão presentes nas Tabelas 9, 10, 11 e 12, juntamente com os dados de média dos sinais, desvio para cada nível, a incerteza associada e os valores do teste de Grubbs, sendo os valores anômalos identificados e assinalados em destaque, que foram removidos da versão final da curva. Concentrações que afetavam os resultados para linearidade também foram removidas.

**Tabela 9.** Dados da curva analítica do ácido cafeico obtidos por HPLC-DAD

[C] mg L <sup>-1</sup>	SINAL 1	SINAL 2	SINAL 3	Média	DSV	INCERT	Teste- Z 1	Teste- Z 2	Teste- Z 3
800	668,087	672,085	704,463	681,5449	19,948	49,557	0,675	0,474	1,149
700	626,042	708,441	698,42	677,6342	44,961	111,697	1,148	0,685	0,462
600	492,186	549,621	568,902	536,9032	39,908	99,145	1,121	0,319	0,802
500	409,873	455,925	453,367	439,7217	25,881	64,298	1,153	0,626	0,527
400	334,577	361,08	348,466	348,0412	13,257	32,934	1,016	0,984	0,032
300	298,805	268,114	276,143	281,0205	15,916	39,541	1,117	0,811	0,306
200	212,36	212,711	211,987	212,3527	0,362	0,899	0,019	0,990	1,009
100	131,329	163,004	129,831	141,3880	18,735	46,544	0,537	1,154	0,617
50	85,0409	83,0272	78,8181	82,2954	3,175	7,888	0,865	0,230	1,095

Fonte: Elaboração própria

\*Médias, desvio padrão (DSV), incerteza (INCERT) e resultados do teste de Grubbs (Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, Z<sub>3</sub>) aplicados para detecção de valores outliers

[C] = concentração da solução em mg L<sup>-1</sup>

**Tabela 10.** Dados da curva analítica do ácido salicílico obtidos por HPLC-DAD

[C] mg L <sup>-1</sup>	SINAL 1	SINAL 2	SINAL 3	Média	DSV	INCERT	Teste- Z 1	Teste- Z 2	Teste- Z 3
800	115,1192	137,562	143,699	132,1266	15,045	37,377	1,130	0,361	0,769
700	142,621	111,34	127,638	127,1996	15,645	38,868	0,986	1,014	0,028
600	120,0777	112,179	105,426	112,5607	7,333	18,219	1,025	0,052	0,973
500	100,9762	88,6183	88,4548	92,6831	7,183	17,844	1,155	0,566	0,589
400	87,0293	71,9247	66,9875	75,3138	10,442	25,941	1,122	0,325	0,797
300	66,7529	55,5119	55,0533	59,1060	6,626	16,462	1,154	0,542	0,612
200	42,0307	39,3143	41,605	40,9833	1,461	3,630	0,717	1,142	0,426
100	17,6198	19,329	19,369	18,7726	0,999	2,481	1,154	0,557	0,597
50	15,1997	13,576	13,8372	14,2043	0,872	2,166	1,142	0,721	0,421

Fonte: Elaboração própria

**Tabela 11.** Dados da curva analítica da rutina obtidos por HPLC-DAD

[C] mg L <sup>-1</sup>	SINAL 1	SINAL 2	SINAL 3	Média	DSV	INCERT	Teste- Z 1	Teste- Z 2	Teste- Z 3
25	8,6864	8,6798	8,651	8,6724	0,019	0,047	0,744	0,393	1,137
75	16,4123	16,607	16,3756	16,4650	0,124	0,309	0,423	1,142	0,719
125	24,9124	24,9719	24,5955	24,8266	0,202	0,503	0,424	0,718	1,142
175	40,5863	31,9457	32,4421	34,9914	4,852	12,053	1,153	0,628	0,525
225	39,1238	40,9664	40,7702	40,2868	1,012	2,514	1,149	0,672	0,478
275	51,0285	52,4185	51,4463	51,6311	0,713	1,772	0,845	1,104	0,259
325	59,29	58,0766	60,1438	59,1701	1,039	2,581	0,115	1,053	0,937
375	67,7457	67,2773	68,9987	68,0072	0,890	2,211	0,294	0,820	1,114
425	72,8778	78,5434	78,8247	76,7486	3,355	8,335	1,154	0,535	0,619

Fonte: Elaboração própria

**Tabela 12.** Dados da curva analítica da Substância 4 obtidos por HPLC-DAD

[C] mg L <sup>-1</sup>	SINAL 1	SINAL 2	SINAL 3	Média	DSV	INCERT	Teste- Z 1	Teste- Z 2	Teste- Z 3
<b>25</b>	12,0357	11,7904	10,1409	11,3223	1,030	2,560	0,692	0,454	1,146
<b>75</b>	22,0126	22,8463	14,3365	19,7318	4,691	11,654	0,486	0,664	1,150
<b>125</b>	31,315	31,5304	30,6156	31,1537	0,478	1,188	0,337	0,788	1,125
<b>175</b>	50,1372	41,0368	42,3592	44,5111	4,917	12,216	1,144	0,707	0,438
<b>225</b>	50,3805	53,2035	52,5865	52,0568	1,484	3,687	1,129	0,773	0,357
<b>275</b>	65,6644	67,1066	66,5585	66,4432	0,728	1,809	1,070	0,911	0,158
<b>325</b>	76,8616	74,9336	77,144	76,3131	1,203	2,989	0,456	1,147	0,691
<b>375</b>	86,212	86,9337	86,2109	86,4522	0,417	1,036	0,576	<b>1,155</b>	0,579
<b>425</b>	85,891	89,1219	99,1355	91,3828	6,906	17,156	0,795	0,327	1,123

Fonte: Elaboração própria

A ANOVA, obtida pelo software SAS Studio, foi aplicada para os analitos avaliados, e os resultados estão apresentados na Tabela 13. As faixas lineares foram determinadas a partir da análise conjunta do valor de F da regressão e da falta de ajuste, considerando significância (p) menor que 0,05 para a regressão e maior que este mesmo valor para a falta de ajuste. Para a maioria dos analitos, os limites da faixa linear foram definidos com base na adequação estatística dos modelos, sendo realizados ajustes quando necessário. No caso específico da xantona, a curva já apresentava regressão significativa e falta de ajuste não significativa considerando todos os pontos, atendendo aos critérios de linearidade. Entretanto, alguns pontos foram removidos devido à identificação de *outliers* pelo teste de Grubbs, com o objetivo de aprimorar a qualidade estatística do ajuste, e não por inadequação do modelo quanto à linearidade.

**Tabela 13.** Análise de variância aplicada às curvas analíticas dos analitos

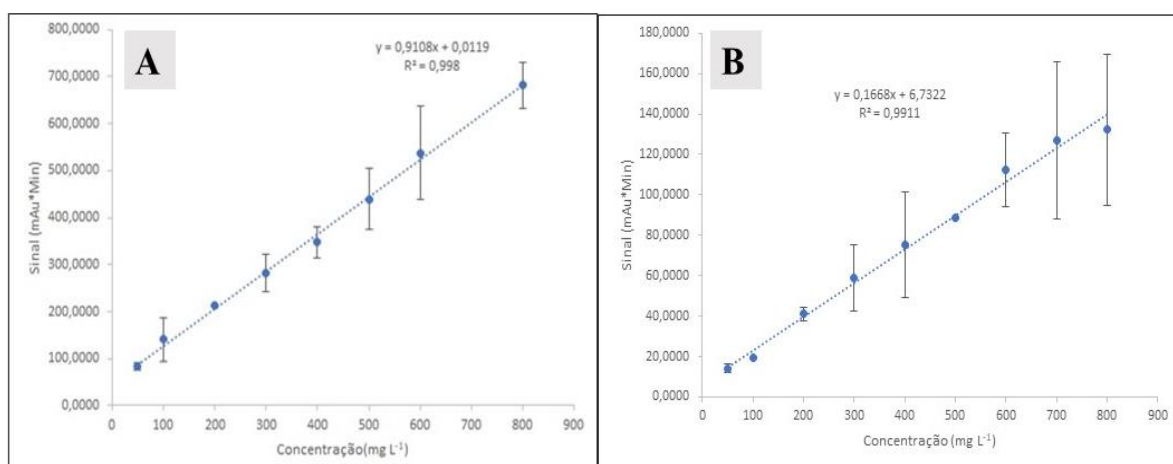
<b>Ácido Cafeico</b>						
Modelo	<b>F</b> <sub>REG</sub>	<b>F</b> <sub>CRIT. REG</sub>	<b>F</b> <sub>FA</sub>	<b>F</b> <sub>Crítico</sub> FA	<b>P</b> <sub>REG</sub>	<b>P</b> <sub>FA</sub>
<b>Com todos os pontos</b>	1126,01	4,24	3,49	2,58	<.0001	0,0153
<b>Com correção de alguns pontos</b>	2079,60	4,30	0,89	2,74	<.0001	0,5229
<b>Ácido Salicílico</b>						
Modelo	<b>F</b> <sub>REG</sub>	<b>F</b> <sub>CRIT. REG</sub>	<b>F</b> <sub>FA</sub>	<b>F</b> <sub>Crítico</sub> FA	<b>P</b> <sub>REG</sub>	<b>P</b> <sub>FA</sub>
<b>Com todos os pontos</b>	621,36	4,24	0,78	2,58	<.0001	0,6132
<b>Rutina</b>						
Modelo	<b>F</b> <sub>REG</sub>	<b>F</b> <sub>CRIT. REG</sub>	<b>F</b> <sub>FA</sub>	<b>F</b> <sub>Crítico</sub> FA	<b>P</b> <sub>REG</sub>	<b>P</b> <sub>FA</sub>
<b>Com todos os pontos</b>	3383,19	4,24	0,69	2,58	<.0001	0,6819
<b>Substância 4</b>						
Modelo	<b>F</b> <sub>REG</sub>	<b>F</b> <sub>CRIT. REG</sub>	<b>F</b> <sub>FA</sub>	<b>F</b> <sub>Crítico</sub> FA	<b>P</b> <sub>REG</sub>	<b>P</b> <sub>FA</sub>
<b>Com todos os pontos</b>	1582,39	4,24	1,51	2,58	<.0001	0,2251
<b>Com correção de alguns pontos</b>	1450,95	4,26	1,38	2,61	<.0001	0,2756

Fonte: Elaboração própria

\*Nota: REG. – Regressão, CRIT. – Crítico, FA - Falta de ajuste

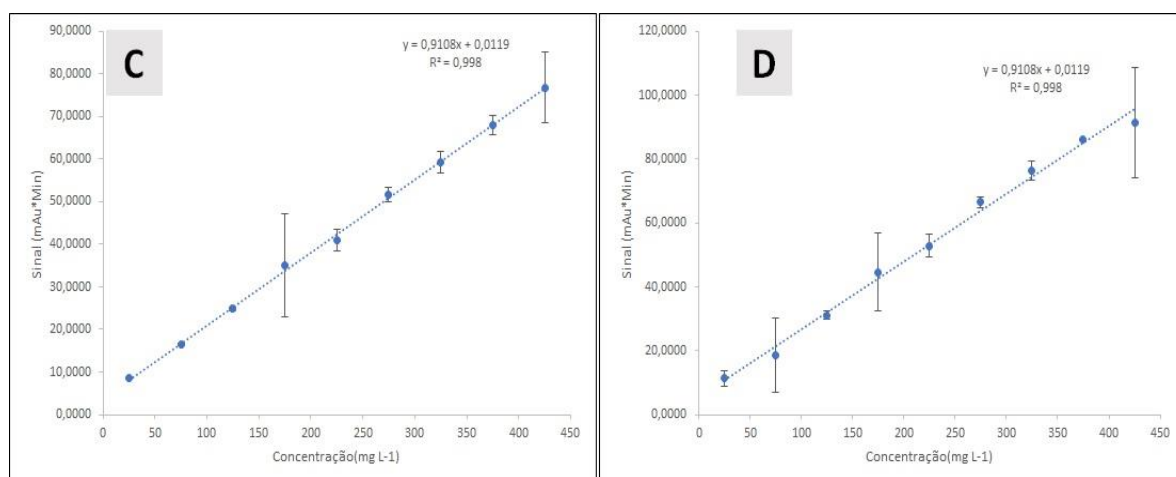
\*\* Valores de F da regressão (FREG), valor crítico da regressão (FCRIT.REG), F do teste de falta de ajuste (FFA), valor crítico de FFA (FCríticoFA) e respectivos valores de p (PREG e PFA)

Assim, a faixa linear de trabalho para o ácido cafeico, ácido salicílico, rutina e substância **4**, foram definidas como sendo, aproximadamente 50,0 mg L<sup>-1</sup> até ~ 800 mg L<sup>-1</sup> para o ácido cafeico e o ácido salicílico, enquanto a rutina e a substância **4**, aproximadamente 25,0 mg L<sup>-1</sup> até ~ 425 mg L<sup>-1</sup>. As Figuras 18 e 19 apresentam os gráficos obtidos para cada análise.



**Figura 18.** Curvas de calibração obtidas por HPLC-DAD. (A) Ácido cafeico. (B) Ácido salicílico

Fonte: Elaboração própria



**Figura 19.** Curvas de calibração obtidas por HPLC-DAD. (C) Rutina. (D) Substância 4

Fonte: Elaboração própria

A curva de calibração foi utilizada para obter a equação da reta de cada analito, incluindo os valores dos coeficientes angular e linear. As linearidades foram avaliadas de acordo com o método proposto pela IUPAC (Oliveira, 2015). Este método considera a curva estatisticamente não linear, a um nível de significância  $\alpha$ , quando o valor de F experimental ( $F_{EXP}$ ) excede o valor crítico  $F(\alpha, I-2, I-L)$ , onde I é o número de amostras de calibração e L é o número de níveis de concentração. Caso contrário, a curva é considerada linear. Os dados encontram-se na Tabela 14. Com base nessa análise, todas as curvas de calibração construídas apresentaram comportamento linear dentro do nível de significância adotado.

**Tabela 14.** Valor médio do coeficiente Linear, angular e do F's para determinação da linearidade

<b>Ácido Cafeico</b>			
<b>Coeficiente Angular</b>	Coeficiente Linear	F <sub>EXP</sub>	F <sub>Crit.</sub>
<b>0,9108</b>	0,0119	0,97	2,25
<b>Ácido Salicilico</b>			
<b>Coeficiente Angular</b>	Coeficiente Linear	F <sub>EXP</sub>	F <sub>Crit.</sub>
<b>0,1668</b>	6,7322	0,94	2,14
<b>Rutina</b>			
<b>Coeficiente Angular</b>	Coeficiente Linear	F <sub>EXP</sub>	F <sub>Crit.</sub>
<b>0,9108</b>	0,0119	0,91	2,14
<b>Substância 4</b>			
<b>Coeficiente Angular</b>	Coeficiente Linear	F <sub>EXP</sub>	F <sub>Crit.</sub>
<b>0,9108</b>	0,0119	1,14	2,14

Fonte: Elaboração própria

Nota: EXP. - Experimental, Crit. – Crítico

#### 4.2.1.2 Limite de detecção e de quantificação

Os limites de quantificação (LQ) e limites de detecção (LD) foram calculados por meio das equações 1 e 2, utilizando dados obtidos das curvas de calibração. Sendo assim, os limites encontrados para ácido cafeico, ácido salicílico, rutina e substância **4**, encontram-se na Tabela 15.

**Tabela 15.** Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) determinados para os analitos ácido cafeico, ácido salicílico, rutina e xantona. Valores expressos em mg L<sup>-1</sup>, calculados a partir das equações obtidas pelas curvas de calibração

<b>Analito</b>	<b>Limite de Detecção (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Limite de Quantificação (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Ác. Cafeico</b>	28,980	95,635
<b>Ác. Salicílico</b>	57,334	189,201
<b>Rutina</b>	13,379	44,152
<b>Substância 4</b>	19,563	64,559

Fonte: Elaboração própria

### 4.3 Isolamento de metabólitos secundários a partir das frações particionadas de *S. trichosperma*

A prospecção fitoquímica das frações hexânica e clorofórmica de *S. trichosperma* resultou no isolamento e caracterização estrutural de três metabólitos secundários pertencentes às classes das cumarinas e xantonas, reconhecidas por importantes atividades biológicas.

#### 4.3.1 Substância 1 - 2,2-dimetilpiranocumarina

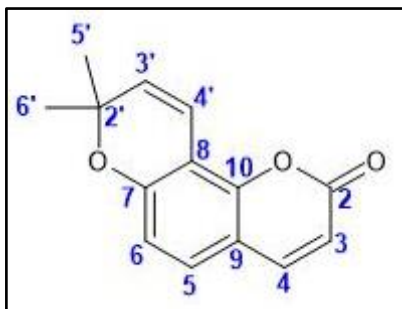
A Substância 1 foi isolada por cromatografia preparativa, obtida na forma de sólido amorfo amarelado de aproximadamente 30 mg. A análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H revelou dois dupletos em  $\delta_H$  6,21 (1H, d, J = 9,5 Hz) e 7,59 (1H, d, J = 9,5 Hz), característicos de um par de hidrogênios vinílicos *cis* endocíclicos do anel cumarínico. Observou-se ainda um segundo par de sinais aromáticos *orto*-acoplados em  $\delta_H$  7,20 (1H, d, J = 8,5 Hz) e 6,70 (1H, d, J = 8,5 Hz), compatível com a presença de um núcleo cumarínico 7-substituído. Os sinais relativos ao anel pirano aparecem como dois dupletos vinílicos em  $\delta_H$  5,75 (1H, d, J = 10,0 Hz; H-3') e 6,86 (1H, d, J = 10,0 Hz; H-4'), além de dois singletos metílicos geminais em  $\delta_H$  1,46 (3H, s; H-5') e 1,46 (3H, s; H-6'), atribuídos ao motivo =C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> característico desse anel. No espectro de RMN de <sup>13</sup>C foi possível observar um sinal de carbonila de éster em  $\delta_C$  160,9 (C-2) e sinais de carbonos oxigenados do anel pirano/aromático em  $\delta_C$  149,96 (C-7). Os sinais registrados em  $\delta_C$  113,46 (C-3), 112,47 (C-6), 127,70 (C-5), 143,89 (C-4) e 109,17 (C-8) são compatíveis com o padrão de cumarinas 7-substituídas. O conjunto desses deslocamentos químicos é característico de uma cumarina O-insaturada condensada a um anel pirano 2,2-dimetil.

Com base na convergência dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (cf. Tabela 16 e Figuras 21–23), e em comparação com valores da literatura (Mukandiwa et al., 2013; de Oliveira et al., 2016; Efe, Lykakis & Stratakis, 2011), a Substância **1** (Figura 20) foi identificada como 2,2-dimetilpiranocumarina (Seselin). Trata-se de um metabólito conhecido, amplamente relatado em diferentes famílias botânicas e associado a diversas atividades biológicas, incluindo efeitos citotóxicos e genotóxicos em modelos celulares (Ostrowska et al., 2017).

**Tabela 16.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  apresentados pela Substância **1** [500 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ),  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta(\text{ppm})$ , J (Hz)]

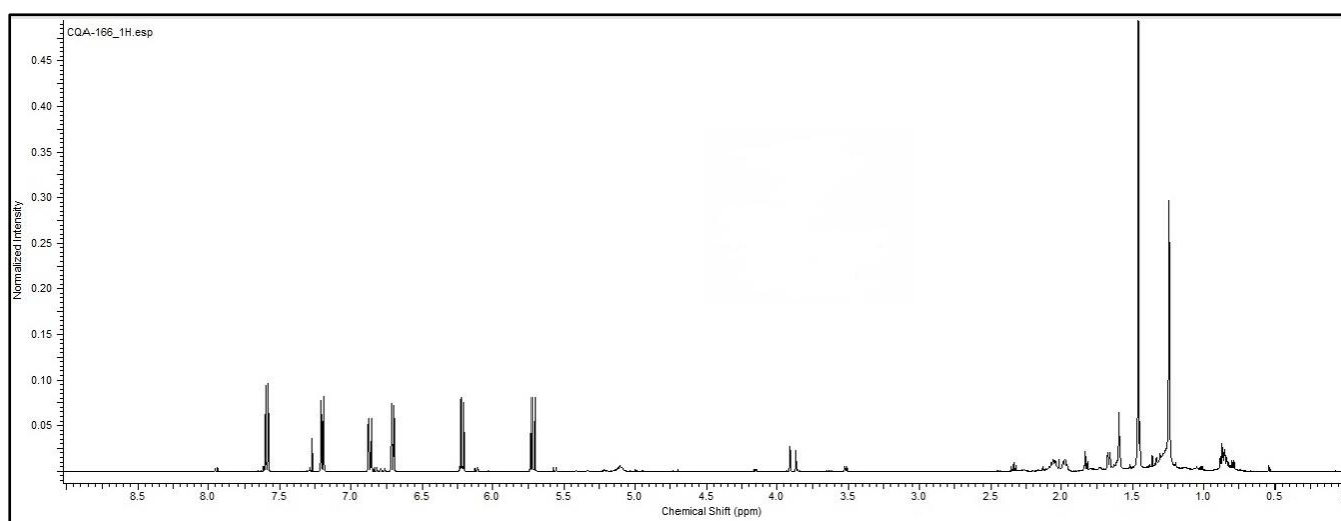
C	$\delta^{13}\text{C}$ ppm/ $\delta^1\text{H}$ (J, Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ ppm/ $\delta^1\text{H}$ Lit*	$\delta^{13}\text{C}$ ppm/ $\delta^1\text{H}$ Lit**	$\delta^{13}\text{C}$ ppm/ $\delta^1\text{H}$ Lit***
<b>1</b>				-
<b>2</b>	160,99		161.0	161.4
<b>3</b>	113,46/6,21 (dd, 1H, J = 9,5 e 1Hz)	113,59; 6,32 (d; 9,6)	112.5/(6.25 d 9.4; H-3)	112.6/6.23 (d, J=9.5 Hz, 1H)
<b>4</b>	143,89/ 7,59 (d, 1H, J = 9,5)	143,44; 7,66 (d; 9,6)	144.0/(7.62 d 9.5; H-4)	144.1/7.61 (d, J=9.5 Hz, 1H)
<b>5</b>	127,70/ 7,20 (d, 1H, J = 8)	131,79; 7,48 (d; 8,8)	127.8/(7.24 d 8.4; H-5)	127.8/7.21 (d, J=8.5 Hz, 1H)
<b>6</b>	112,47/ 6,70 (d, 1H, J = 8,5)	115,11; 6,92 (d; 8,4)	113.5/(6.74 d 8.5; H-6)	113.6/6.72 (d, J=8.5 Hz, 1H)
<b>7</b>	149,96		144.2	156.4
<b>8</b>	109,17			109.3
<b>9</b>	114,88		108.8	
<b>10</b>	156,20		153.22 (C-10)	155,81
<b>1'</b>				
<b>2'</b>	77,52	79.7	77.6	
<b>3'</b>	130,67/(5,72, dd, J=10 e 1Hz)	130.2/(5.75 d 10.0; H-3')	130.8/5.72 (d, J=10.0 Hz, 1H)	
<b>4'</b>	6,86 (d, 1H, J = 10,5)	115.0/(6.91 d 10.0; H-4')	114.9/6.87 (d, J=10.0 Hz, 1H)	
<b>5'</b>	1,46 (d, 3H)			
<b>6'</b>	1,46 (d, 3H)	28.1/(1.48 s; 3H-5'/3H-6')	28.1/1.47 (s, 6H)	

Fonte: Elaboração própria e \*Silva (2020); \*\*de Oliveira et al. (2016); \*\*\*Efe; Lykakis; Stratakis (2011).



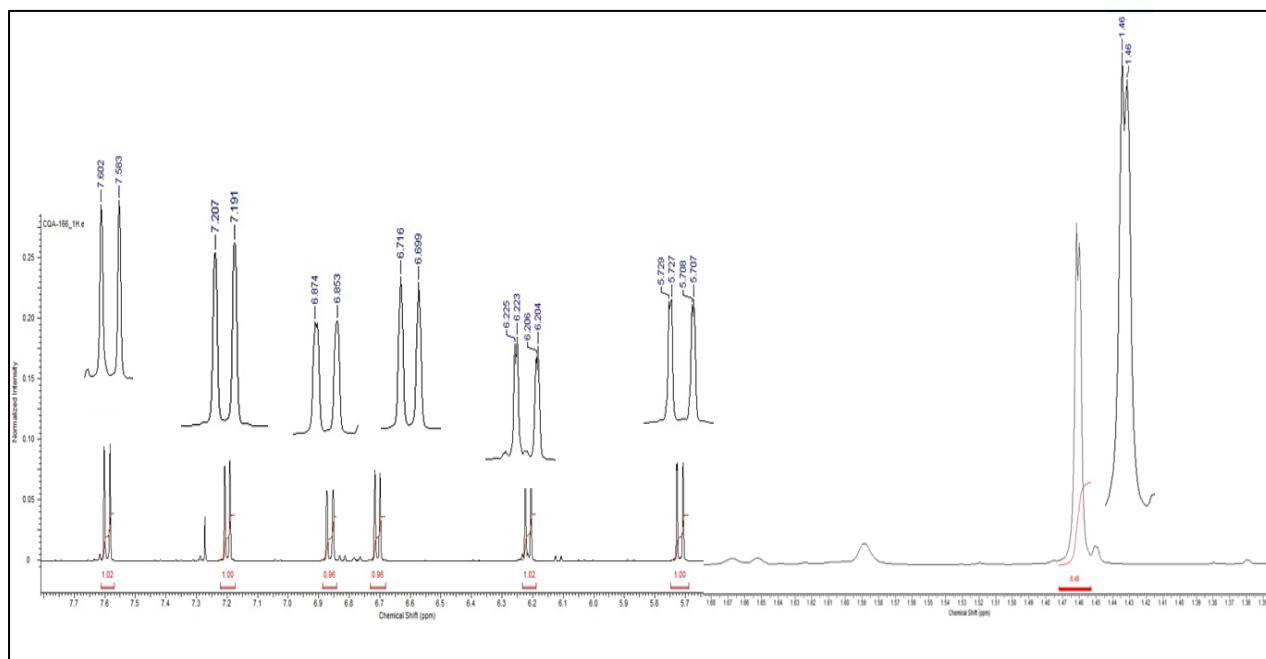
**Figura 20.** Proposta estrutural para a Substância 1, baseada na análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$

Fonte: Elaboração própria



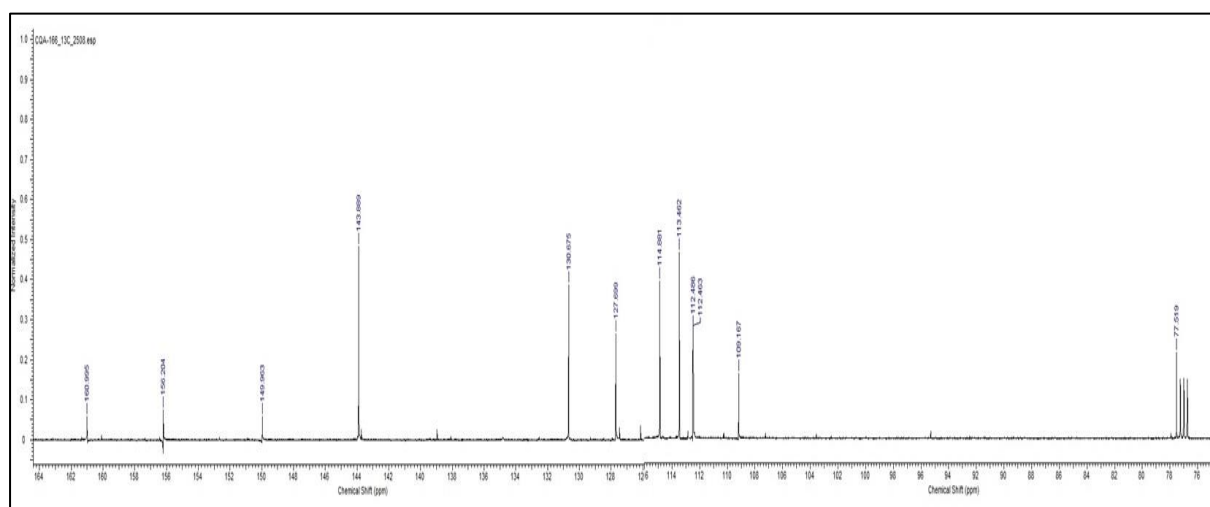
**Figura 21.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância 1.

Fonte: Elaboração própria



**Figura 22.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância **1**, com destaque para a integração dos sinais

Fonte: Elaboração própria



**Figura 23.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância da Substância **1**.

Fonte: Elaboração própria

#### 4.3.2 Substância **2** - 1,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':3,2) - xantona

A Substância **2** foi obtida na forma de cristais amarelos, com massa aproximada de 43 mg. A análise espectroscópica no infravermelho (Figura 24) revelou uma banda larga em  $3400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ , característica de estiramentos O–H fenólicos, além de banda de C–H alifático em

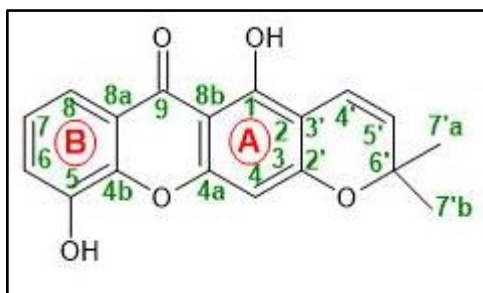
2919  $\text{cm}^{-1}$ . Observou-se também uma banda intensa em 1604  $\text{cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento C=O conjugado do núcleo xantônico, com contribuição de vibrações C=C aromáticas. Bandas em 1230/1209  $\text{cm}^{-1}$  foram atribuídas a estiramentos C–O (aromático/éster), enquanto aquelas em 1163/1104/1030  $\text{cm}^{-1}$  correspondem a estiramentos C–O–C de éteres e do anel pirano. As deformações fora do plano de C–H aromático aparecem entre 830–677  $\text{cm}^{-1}$ , em concordância com os padrões descritos para piranoxantonas na literatura. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 25) evidenciou um sistema aromático 5-substituído no anel B, com sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,42 (1H, d,  $J_{6,7} = 8$  Hz, H-6), 7,30 (1H, dd,  $J_{7,6} = 8$ ;  $J_{7,8} = 10$  Hz, H-7) e 7,48 (1H, d,  $J_{8,7} = 10$  Hz, H-8). Um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  6,43 (1H, s), correspondente a H-4 ne reforçando o padrão típico do anel A de xantonas 1,2,3-trissubstituídas. A presença de um anel pirano fundido ao anel A foi evidenciada por dois dupletos olefínicos em  $\delta_{\text{H}}$  6,62 (1H, d,  $J_{4',5'} = 10$  Hz, H-4') e 5,78 (1H, d,  $J_{5',4'} = 10$  Hz, H-5'), além de um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  1,44 (6H, s) atribuído às metilas geminais C-7'a/C-7'b. O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  13,69 (1H, s) confirma a presença de 1-OH quelatado à carbonila C-9, típico de xantonas 1,5-di-hidroxiladas. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 26), foram detectados dezoito sinais distribuídos entre  $\delta_{\text{C}}$  27,95 e 180,08 ppm. Destacam-se a carbonila conjugada do núcleo xantônico em  $\delta_{\text{C}}$  180,08 (C-9), carbonos aromáticos oxigenados em  $\delta_{\text{C}}$  160,05–156,63 e carbonos aromáticos não hidrogenados em  $\delta_{\text{C}}$  149,00–124,72. Os sinais olefínicos do anel pirano aparecem em torno de  $\delta_{\text{C}}$  130,6 (CH) e 114–115 (CH), enquanto o carbono  $\text{sp}^3$  oxigenado aparece em  $\delta_{\text{C}}$  78,34, valor compatível com C-6'. As metilas geminais foram observadas em  $\delta_{\text{C}}$  27,95.

A análise dos dados de RMN sugere a fórmula molecular  $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}$ . A comparação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  com dados bibliográficos (Tabela 17) permitiu identificar a substância como 1,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano(2',3':3,2)-xantona, também conhecida como 6-desoxijacareubina (Figura 27). Essa estrutura está em concordância com relatos anteriores para espécies das famílias Polygalaceae (Missau, 2008), Guttiferae (Rukachaisirikul et al., 2003) e Podostemaceae (Burkhardt et al., 1992). Este metabólito é amplamente reconhecido por suas atividades biológicas, incluindo efeitos antioxidante, antifúngico, neuroprotetor e citotóxico (Yi et al., 2011; Rocha et al., 1994; Niu et al., 2012; Hoshino et al., 2021).

**Tabela 17.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  apresentados pela Substância **2** [500 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ),  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta(\text{ppm})$ , J (Hz)]

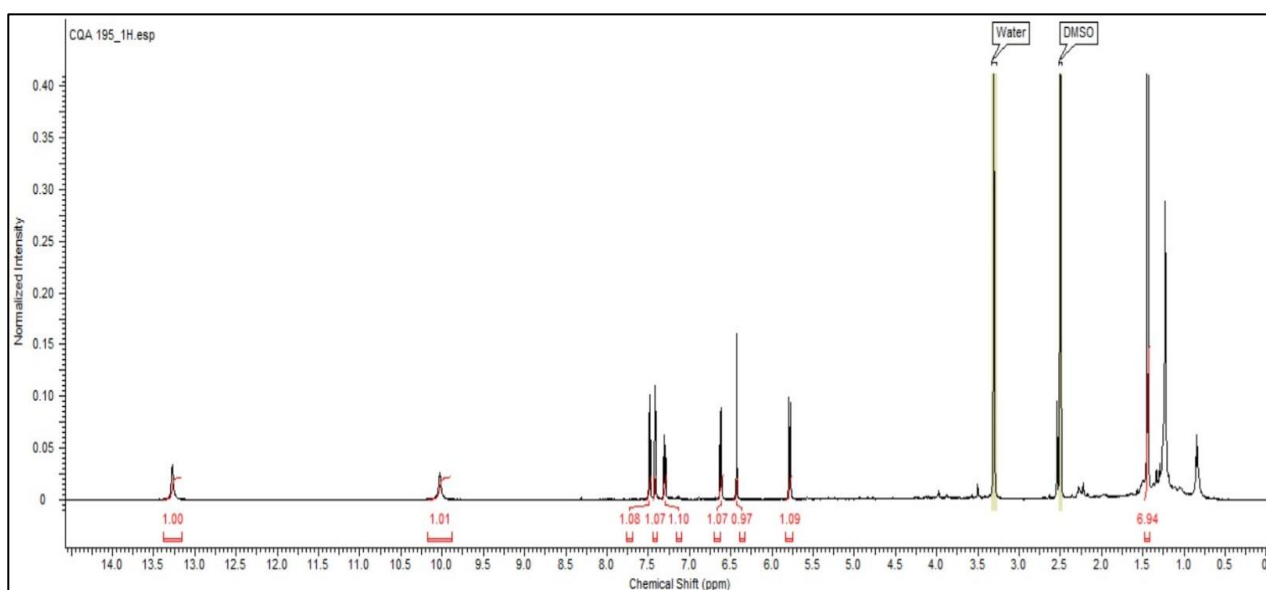
<b>C</b>	$\delta^{13}\text{C}$ ppm/ $\delta$ $^1\text{H}$ (J, Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ ppm/ $\delta$ $^1\text{H}$ Lit*	$\delta^{13}\text{C}$ ppm/ $\delta$ $^1\text{H}$ Lit**
<b>1</b>	160,05	161,15	160,05
<b>2</b>	103,6	99,4	104,8
<b>3</b>	156,63		157,9
<b>4</b>	94,53/ 6,43 (s)	95,95/ 6,55 (s)	95,6/ 6,37 (s)
<b>4a</b>	154,06	152,14	155,2
<b>4b</b>		146,34	
<b>5</b>	149,0	147,93	146,7
<b>6</b>	120,28/ 7,42 (d, 1H, $J_{6,7} = 8$ e $J_{6,8}=2$ )	121,59/ 7,53 (dd, 1H, $J_{6,7} = 7,8$ e $J_{6,8}=1,4$ )	114,1/ 6,88 (d, 1H, $J = 8,9$ )
<b>7</b>	124,72/ 7,30 (dd, 1H, $J_{7,6} = 8$ e $J_{7,8}=10$ )	124,64/ 7,28 (t, 1H, $J_{7,6} = 7,8$ e $J_{7,8}=8,8$ )	127,6/ 5,57 (d, 1H, $J = 10,1$ )
<b>8</b>	117,87/ 7,48 (d, 1H, $J_{8,7} = 10$ e $J_{8,6}=2$ )	115,46/ 7,96 (dd, 1H, $J_{8,7} = 8,1$ e $J_{8,6}=1,4$ )	117,2/ 7,67 (d, 1H, $J = 8,9$ )
<b>8a</b>	119,01	122,07	115,5
<b>8b</b>	102,73	101,72	103,6
<b>9</b>	180,08	181,68	180,7
<b>4'</b>	114,36/ 6,62 (d, 1H, $J_{4',5'} = 10$ )	115,54/ 7,01 (d, 1H, $J_{4',5'} = 10$ )	115,8/ 6,71 (d, 1H, $J = 10,1$ )
<b>5'</b>	128,4/ 5,78 (d, 1H, $J_{5',4'} = 10$ Hz)	127,24/ 5,53 (d, 1H, $J_{5',4'} = 10$ )	130,2
<b>6'</b>	78,34	78,61	78,3
<b>7'a</b>	27,95/ 1,44(s)	28,11/ 1,43(s)	28,7/ 1,45(s)
<b>7'b</b>	27,95/ 1,44(s)	28,11/ 1,43(s)	28,6/ 1,46(s)
<b>OH (quelado)</b>	13,27	13,69	-

Fonte: Elaboração própria e \*Missau (2008); \*\* Zhang et al. (2013).



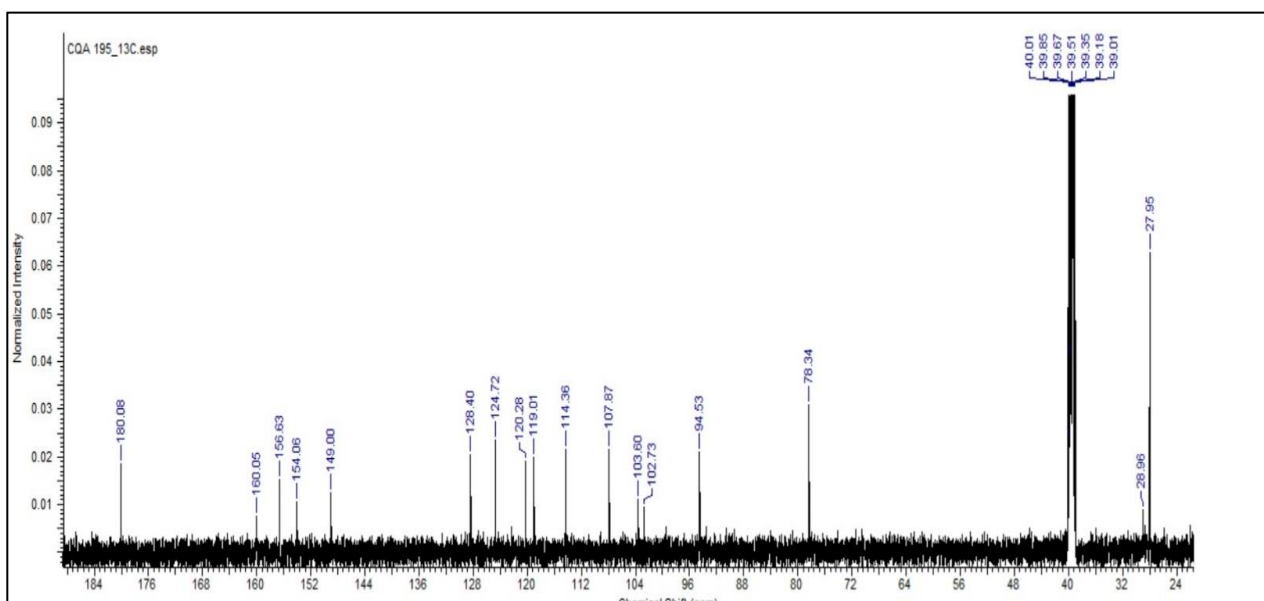
**Figura 24.** Proposta estrutural para a Substância 2, baseada na análise dos espectros de IV e RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$

Fonte: Elaboração própria

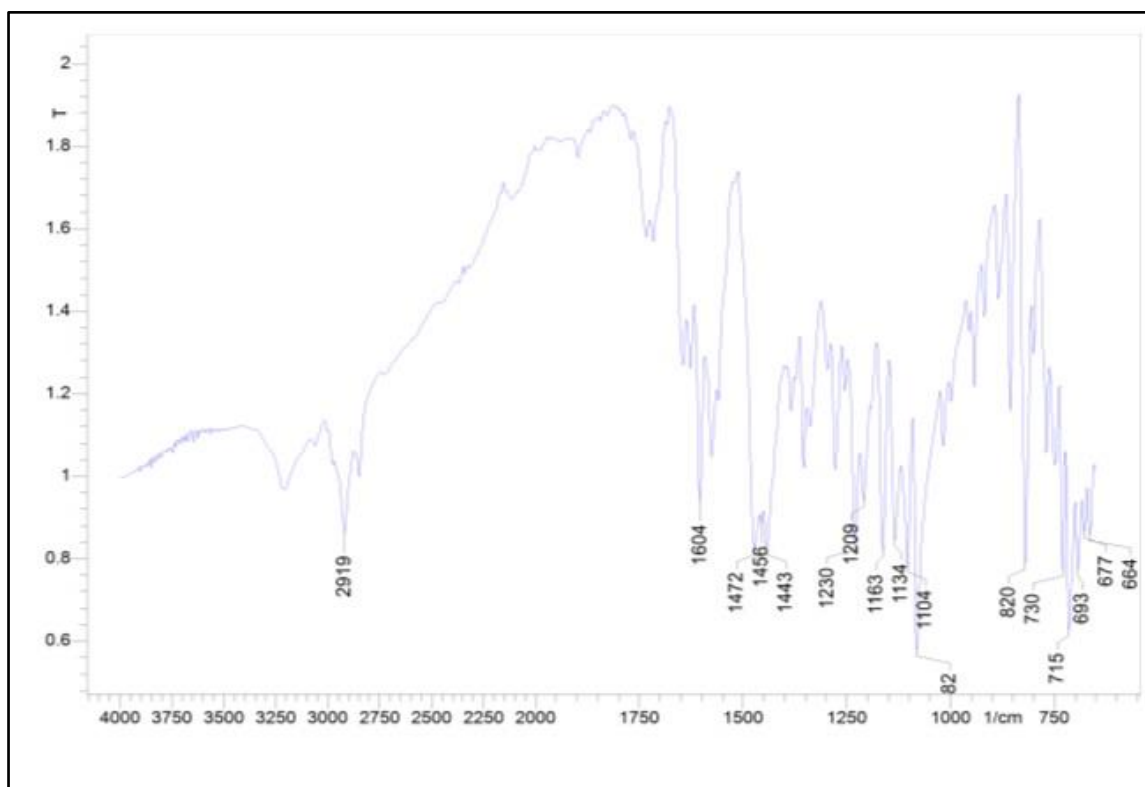


**Figura 25.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO) da Substância 2

Fonte: Elaboração própria



**Figura 26.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO) da Substância 2  
Fonte: Elaboração própria



**Figura 27.** Espectro no infravermelho (IV) da Substância 2  
Fonte: Elaboração própria

#### 4.3.3 Substância **3** - (8-(3-metil-2-butenil) - benzopiran-2-ona)

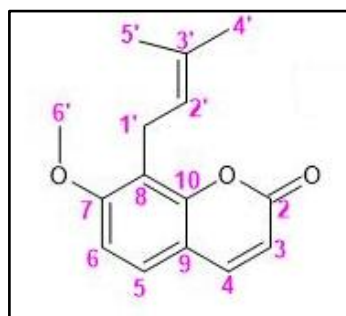
A Substância **3** foi isolada como um precipitado branco, com massa aproximada de 120 mg. A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) revelou um conjunto de sinais característicos de cumarinas preniladas, com um perfil espectral compatível com um núcleo cumarínico substituído na posição C-7 e C-8. Observou-se um par de sinais vinílicos *cis* endocíclicos em  $\delta_{\text{H}}$  6,24 (1H, d,  $J = 9,5$  Hz) e 7,62 (1H, d,  $J = 9,5$  Hz), característicos dos hidrogênios em H-3 e H-4. Dois sinais aromáticos *orto*-acoplados em  $\delta_{\text{H}}$  7,30 (1H, d,  $J = 8,5$  Hz) e 6,85 (1H, d,  $J = 8,5$  Hz) característicos de hidrogênios em C-5 e C-6. A presença de uma cadeia 3-metil-2-butenil (prenil) foi indicada por um sinal vinílico em  $\delta_{\text{H}}$  5,23 (1H, d,  $J = 6,0$  Hz) - [H-2'], dois singletos de metilas geminais em  $\delta_{\text{H}}$  1,86 (3H, s) e 1,64 (3H, s) - [H-4' e H-5'], além de um sinal de metoxi aromático em  $\delta_{\text{H}}$  3,93 (3H, s). No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , observou-se a carbonila de éster do cromeno em  $\delta_{\text{C}}$  160,23 (C-2) e sinais de carbonos aromáticos não hidrogenados e/ou oxigenados em  $\delta_{\text{C}}$  152,83 (C-10). Os carbonos metínicos aromáticos aparecem em  $\delta_{\text{C}}$  143,78 (C-4), 126,22 (C-5), 112,99 (C-3), 107,37 (C-6) e 117,98 (C-8). Os sinais atribuídos à unidade prenil incluem um carbono olefínico em  $\delta_{\text{C}}$  121,14 (C-2'), metílicos em  $\delta_{\text{C}}$  17,94 (C-5') e 25,80 (C-4'), um metileno benzílico em  $\delta_{\text{C}}$  21,94 (C-1') e um metoxi em  $\delta_{\text{C}}$  56,06 (C-6').

A comparação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 28–30) com dados da literatura indicou composição molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$ , correspondente à cumarina prenilada 8-(3-metil-2-butenil) - benzopiran-2-ona, conhecida como osthol, amplamente distribuída em diversas espécies vegetais. A sobreposição dos deslocamentos químicos e integrais com os valores relatados por Shimomura et al. (1979) e Sajadi et al. (2009), bem como em compilações recentes (Tabela 18), confirmou a identidade do composto (Figura 31). Estudos têm demonstrado suas atividades biológicas, incluindo efeitos neuroprotetores, osteogênicos, imunomoduladores e citotóxicos (Zhang et al., 2015), evidenciando seu potencial farmacológico e relevância para investigações fitoquímicas e farmacológicas.

**Tabela 18.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  apresentados pela Substância **3** [500 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ),  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta(\text{ppm})$ , J (Hz)]

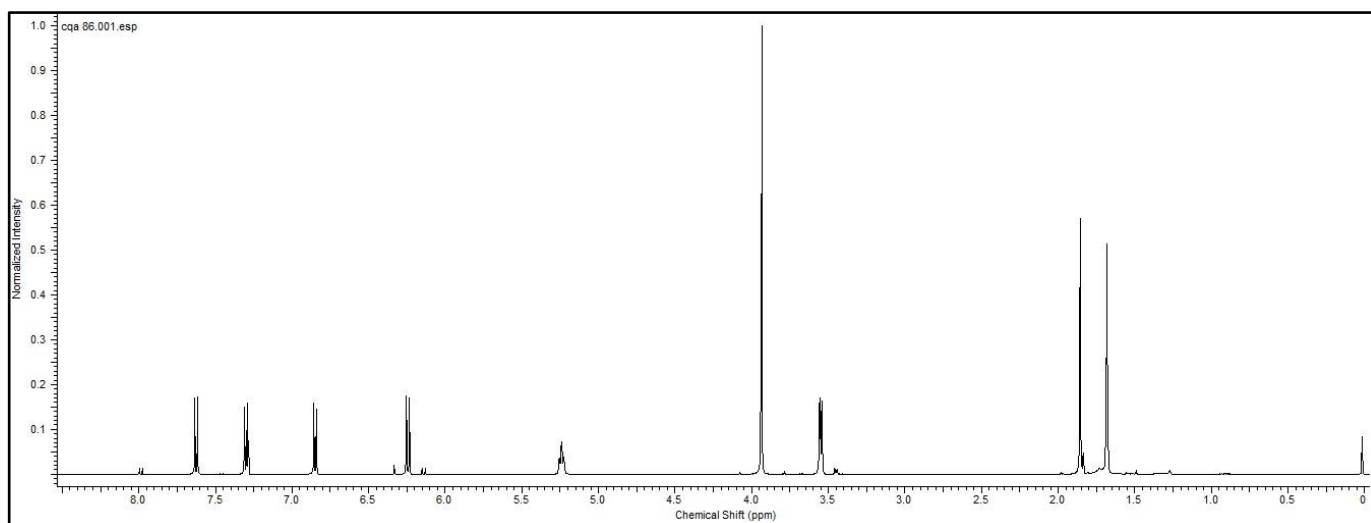
C	$\delta^{13}\text{C}$ ppm/ $\delta$ $^1\text{H}$ (J, Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ ppm/ $\delta$ $^1\text{H}$ Lit*	$\delta^{13}\text{C}$ ppm/ $\delta$ $^1\text{H}$ Lit**
<b>1</b>			-
<b>2</b>	161,42	161.78 (C-2)	162,10
<b>3</b>	112,99/6,24 (d, 1H, J = 9,5)	113.34 (C-3)/ 6.2 (1H, d, J=9.5 Hz, H-3)	112,90/ 6,24 (1H, d, J=9,5)
<b>4</b>	143,78/ 7,62 (d, 1H, J = 9,5)	144.19 (C-4)/ 7.6 (1H, d, J=9.5 Hz, H-4)	143,45/ 7,63 (d, J=9,5)
<b>5</b>	126,22/ 7,30 (d, 1H, J = 8,5)	126.66 (C-5)/ 7.3 (1H, d, J=8 Hz, H-5)	128,65/ 7,36 (d, J=8,2)
<b>6</b>	107,37/6,85 (d, 1H, J = 8,5)	107.78 (C-6)/ 6.8 (1H, d, J=8 Hz, H-6)	6,84 (dd, J=8,2 e 2,3)
<b>7</b>	160,23	160.64 (C-7)	161,30
<b>8</b>	117,98	118.32 (C-8)	118,34/ 5,46 (t, J=6,6)
<b>9</b>	110,71	113.39 (C-9)	112,38
<b>10</b>	152,83	153.22 (C-10)	155,81
<b>1'</b>	21,94/3,55 (d, 2H, J = 7,5)	22.34 (C-1')/ 3.55 (2H, d, J=7.3 Hz, H-1')	
<b>2'</b>	121,14/5,23 (d, 1H, J = 6)	121.57 (C-2')/ 5.25 (1H, t, J=7.3 Hz, H-2')	123,56/ 5,08 (m)
<b>3'</b>	132,66	133 (C-3')	131,94
<b>4'</b>	25,80/1,86 (s, 3H)	26.20 (C-4')/ 1.86 (3H, s, H-4')	26,18 /2,10 (m)
<b>5'</b>	17,94/1,64 (s, 3H)	18.34 (C-5')/ 1.69 (3H, s, H-5')	
<b>6'</b>	56,06/3,93 (s, 3H)	56.46 (C-6')/ 3.94 (3H, s, H-6')	

Fonte: Elaboração própria e \* Sajadi et al., 2009; \*\* Tizziani, 2019.

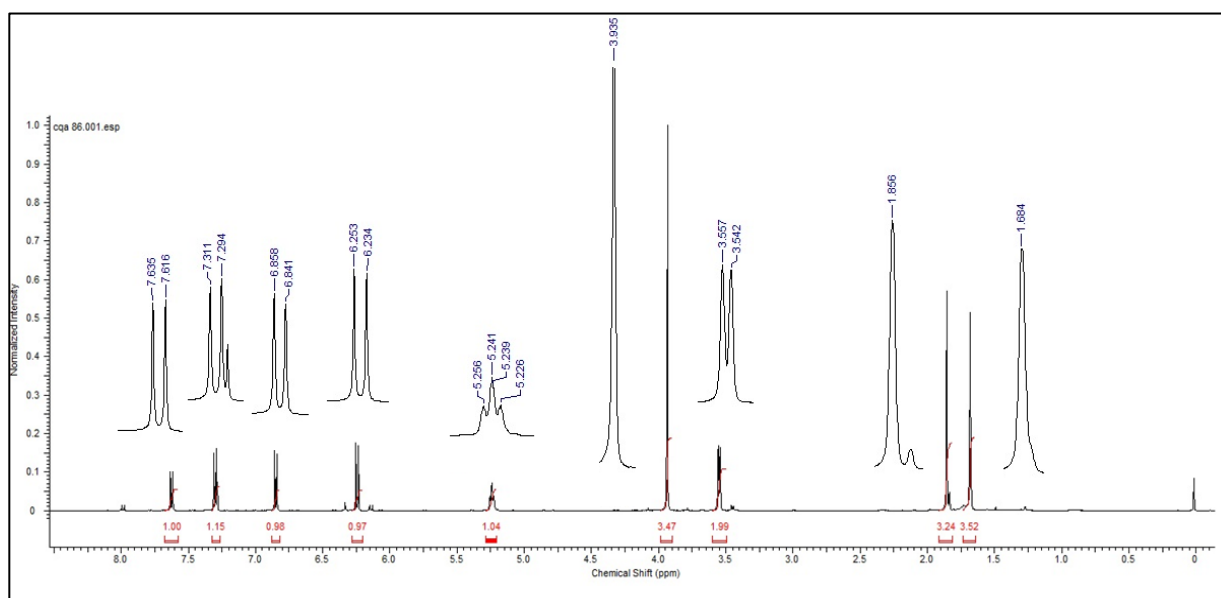


**Figura 28.** Proposta estrutural para a Substância **3**, baseada na análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$

Fonte: Elaboração própria

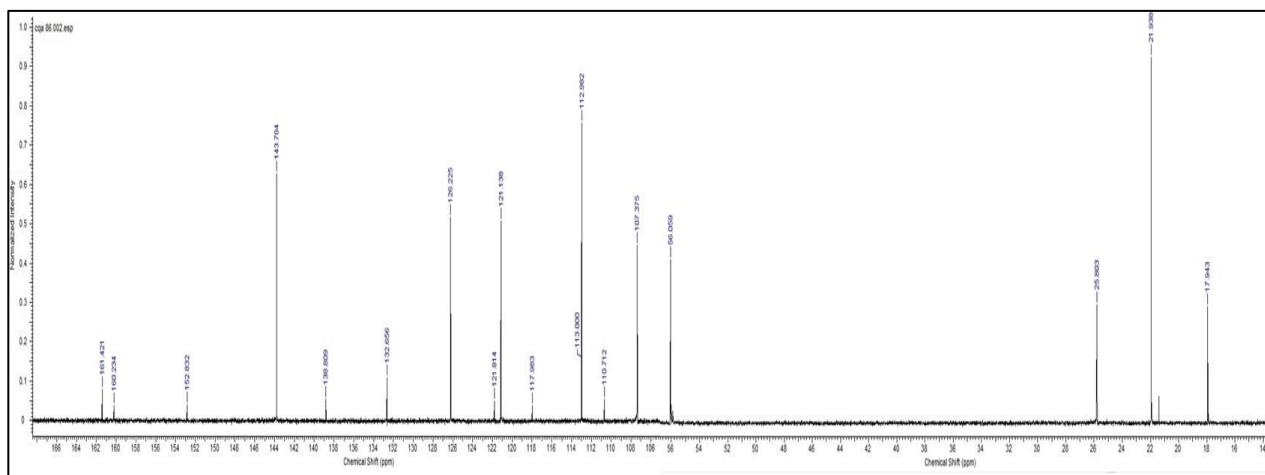


**Figura 29.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância **3**  
Fonte: Elaboração própria



**Figura 30.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância **3**, com destaque para a integração dos sinais

Fonte: Elaboração própria



**Figura 31.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância **3**

Fonte: Elaboração própria

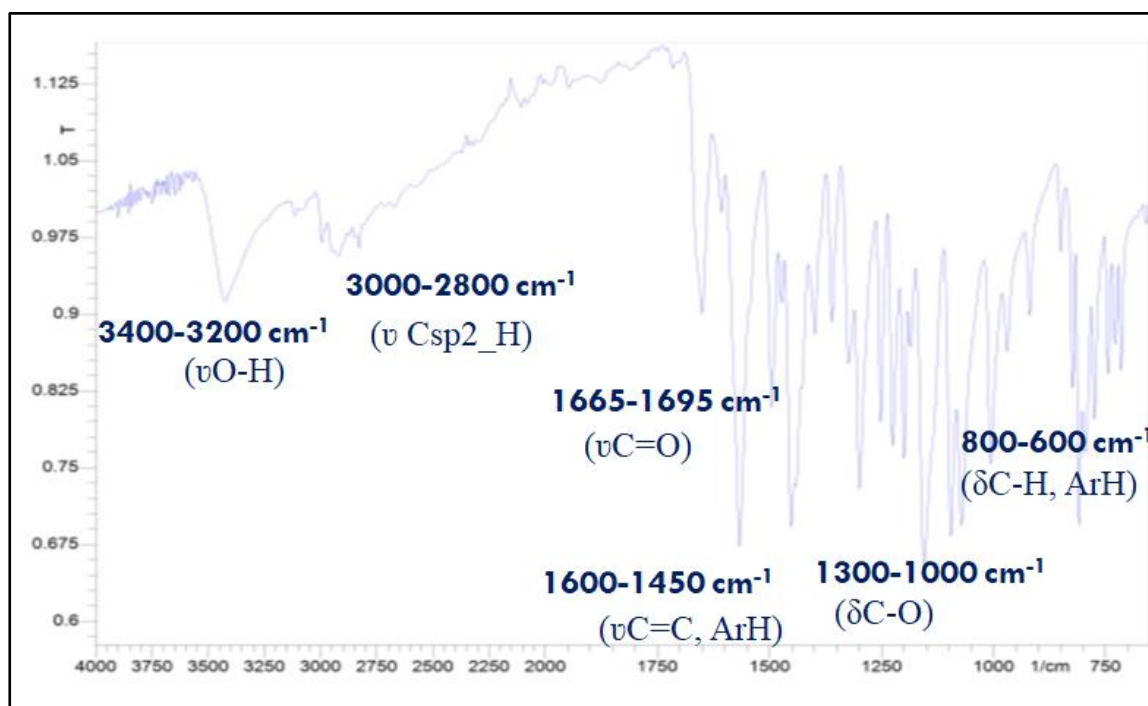
#### 4.4 Isolamento de metabólitos secundários a partir das frações particionadas de *S. pulchella*

A prospecção fitoquímica das frações clorofórmica e acetato de etila de *S. pulchella* resultou no isolamento e caracterização estrutural de um metabólito secundário, presente em ambas as frações, pertencente à classe das xantonas, reconhecidas por atividades biológicas relevantes.

##### 4.4.1 Substância **4** - (1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona)

A Substância **4** foi obtida como um sólido amorfo de coloração amarela, com massa aproximada de 200 mg.

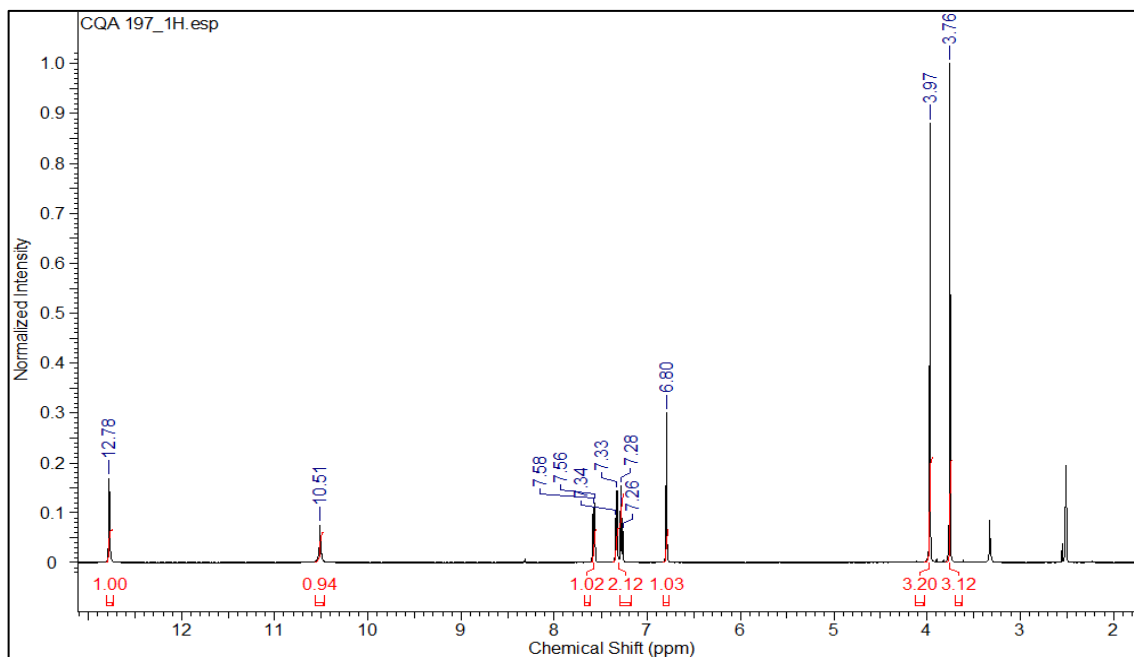
A análise do espectro de infravermelho (Figura 32) revelou uma banda larga em  $3400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento O–H fenólico, e sinais de C–H alifático em  $2950\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$ . Observou-se ainda uma banda intensa em torno de  $1665\text{--}1695\text{ cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento C=O conjugado do núcleo xantônico, acompanhada de absorções em  $1600\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$  associadas a vibrações C=C aromáticas. Bandas na região de  $1300\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas a estiramentos C–O de fenóis, éteres aromáticos e metoxilas, configurando um perfil espectral típico de xantonas polifenólicas O-metoxiladas.



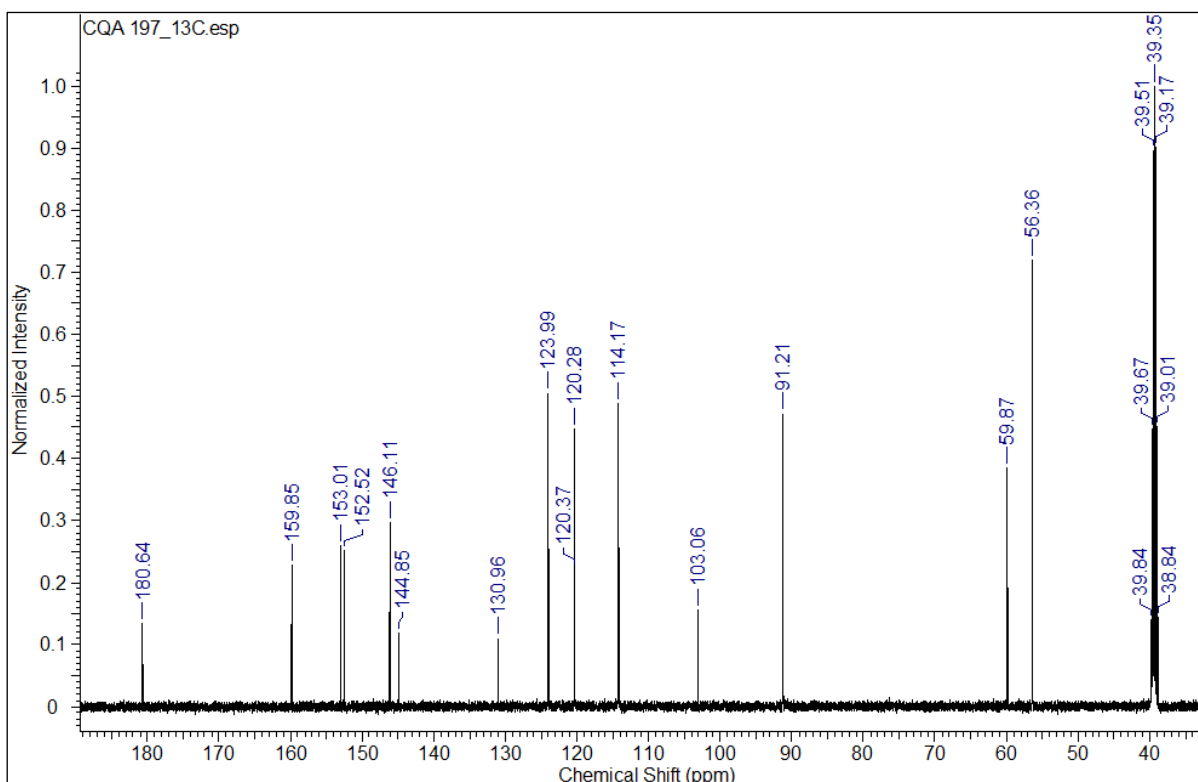
**Figura 32.** Espectro no infravermelho (IV) da Substância 4

Fonte: Elaboração própria

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; Figura 33) apresentou três sinais aromáticos formando um padrão *orto-meta* compatível com um anel tri-substituído, em  $\delta_{\text{H}}$  7,33 (1H, dd,  $J = 7,8$  e  $1,5$  Hz, H-6), 7,56 (1H, dd,  $J = 7,8$  e  $1,5$  Hz, H-8) e 7,31 (1H, m, H-7). Observou-se também um singlete aromático em  $\delta_{\text{H}}$  6,80 (1H, s, H-4), característico de um anel pentassubstituído, dois hidrogênios fenólicos quelatáveis em  $\delta_{\text{H}}$  10,51 e 12,78 (1H, s, cada), além de dois singletos de metoxilas em  $\delta_{\text{H}}$  3,98 e 3,76 (3H, s, cada), consistentes com substituição 2,3-di- $\text{OCH}_3$ . O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 34) revelou 15 carbonos distintos. Identificaram-se uma carbonila conjugada em  $\delta_{\text{C}}$  180,80 (C-9), carbonos aromáticos e oxigenados em  $\delta_{\text{C}}$  159,85; 153,01; 152,52; 146,11; 144,85 e 130,96, carbonos metínicos aromáticos em  $\delta_{\text{C}}$  123,99; 120,28; 114,17 e 91,21, e carbonos quaternários em  $\delta_{\text{C}}$  120,37 e 103,06.



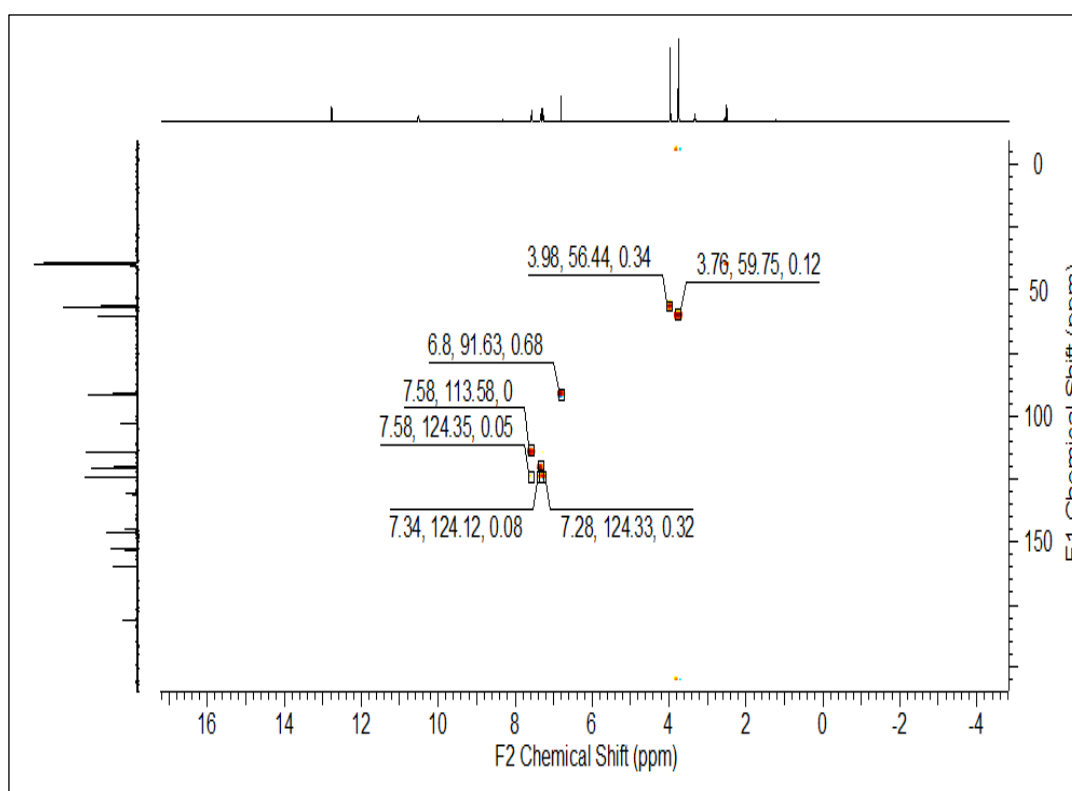
**Figura 33.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância 4  
Fonte: Elaboração própria



**Figura 34.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância 4  
Fonte: Elaboração própria

A análise bidimensional via HMQC (Figura 35) permitiu estabelecer as correlações diretas entre hidrogênios e seus respectivos carbonos. O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  6,80 (H-4) apresentou

correlação com o sinal em  $\delta_C$  91,63, característico de um carbono metínico pertencente ao núcleo xantônico. Os sinais atribuídos a H-8 ( $\delta_H$  7,56), H-6 ( $\delta_H$  7,34) e H-7 ( $\delta_H$  7,31) correlacionaram-se com carbonos no intervalo de  $\delta_C$  113,58 a 124,35, compatíveis com carbonos insaturados do anel conjugado, típico de um núcleo xantônico substituído por grupos hidroxila e metoxila. As metoxilas em  $\delta_H$  3,98 e 3,76 correlacionaram-se diretamente com  $\delta_C$  56,44 e 59,75, respectivamente, evidenciando dois grupos  $-\text{OCH}_3$ , conforme o padrão 2,3-dimetoxilado.

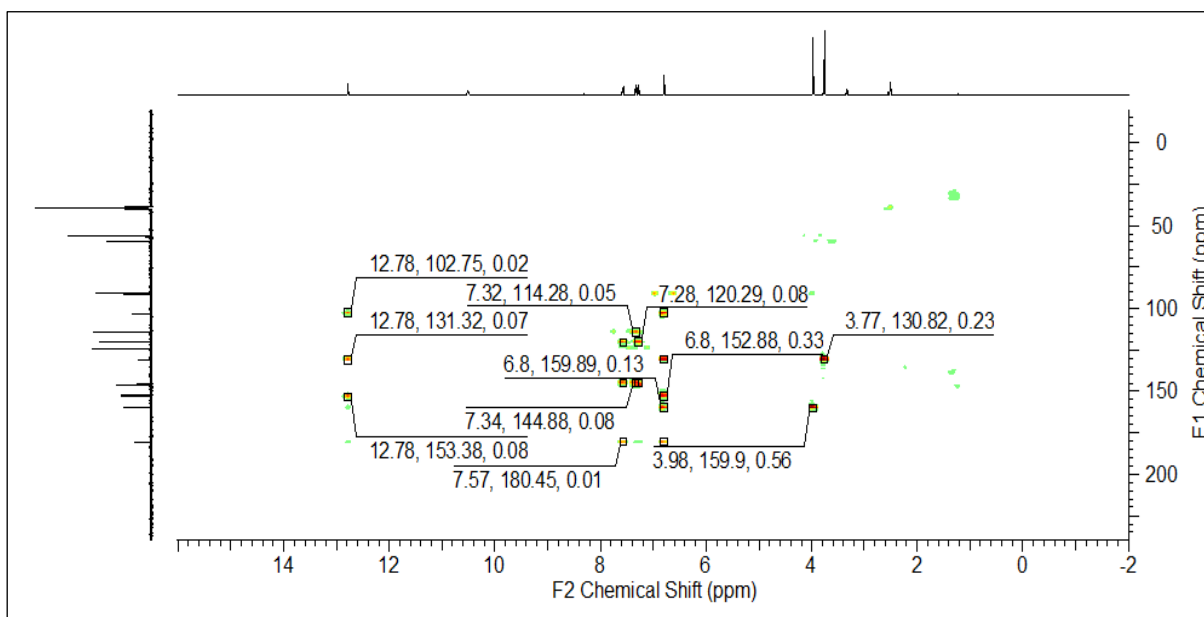


**Figura 35.** Espectro de HMBC (500/125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância 4

Fonte: Elaboração própria

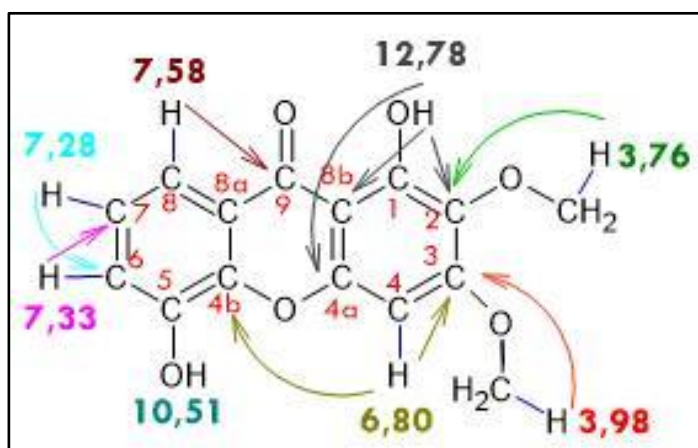
No espectro HMBC (Figura 36), observaram-se correlações de dois e três ligações ( $^2J$  e  $^3J\text{-HC}$ ) que permitiram definir a conectividade entre os fragmentos estruturais. O hidrogênio fenólico em  $\delta_H$  12,78, atribuído à hidroxila em C-1, apresentou correlações com  $\delta_C$  102,75 (C-2), 131,32 (C-9a) e 153,38 (C-1), confirmando sua posição *orto* à ponte C-8b–C-9 e justificando o deslocamento quelatogênico característico de xantonas 1-hidroxiladas. O sinal em  $\delta_H$  6,80 (H-4) apresentou correlações de longo alcance com  $\delta_C$  152,88 (C-3) e 159,89 (C-4b), compatíveis com acoplamentos em sistemas aromáticos conjugados. Os hidrogênios H-8 ( $\delta_H$  7,58) e 1-OH ( $\delta_H$  12,78) correlacionaram-se com a carbonila conjugada em  $\delta_C$  180,45 (C-9),

evidenciando a extensão da conjugação  $\pi$  entre os anéis A e B. As metoxilas em  $\delta_H$  3,98 (OCH<sub>3</sub>-C-2) e 3,76 (OCH<sub>3</sub>-C-3) apresentaram correlações com  $\delta_C$  159,9 (C-2) e 130,82 (C-3), respectivamente, confirmando as posições substituídas e o padrão 2,3-dimetoxilado. As correlações observadas nos espectros bidimensionais (Figuras 26–28) foram determinantes para o estabelecimento da conectividade entre os anéis e a confirmação estrutural do composto (Figura 37).



**Figura 36.** Espectro de HMBC (500/125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da Substância 4

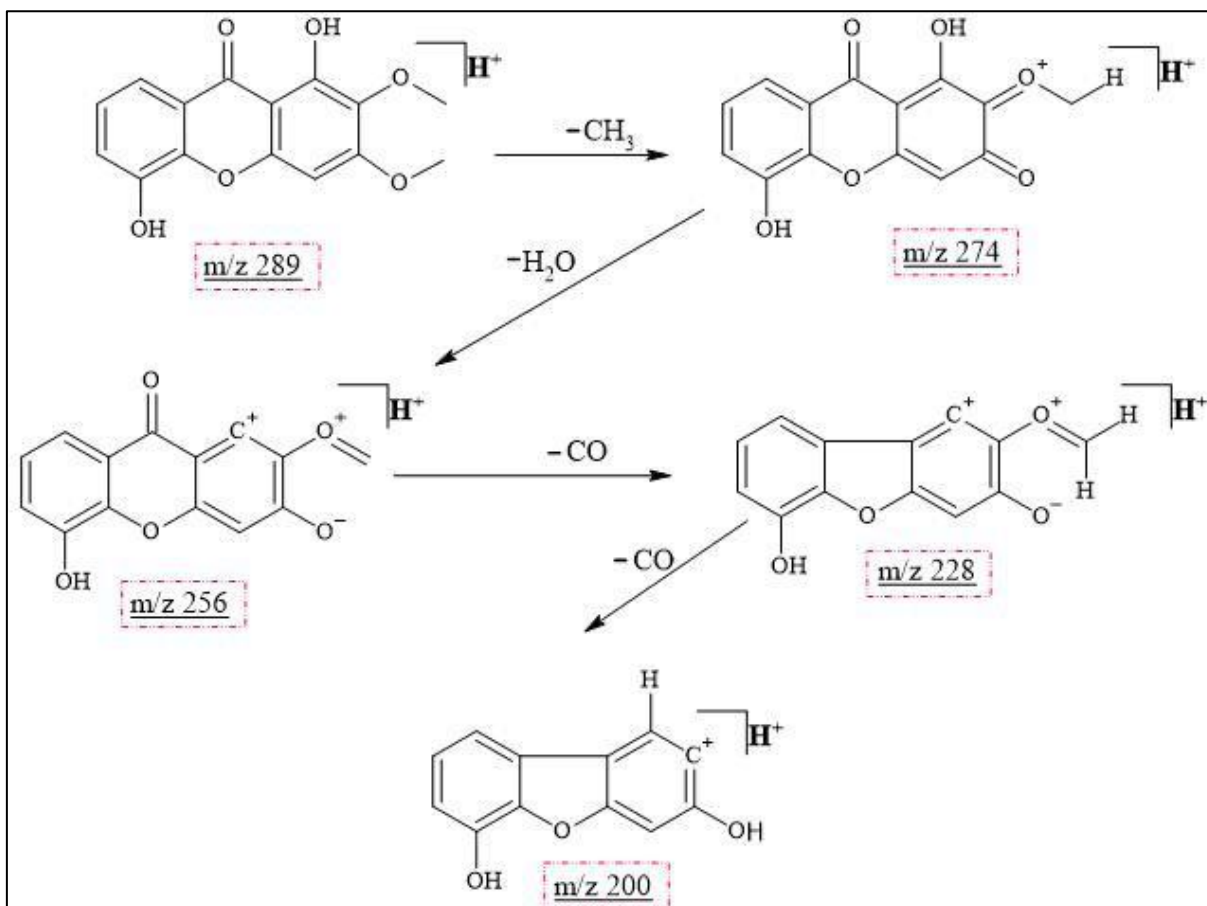
Fonte: Elaboração própria



**Figura 37.** Correlações heteronucleares observadas no espectro de RMN bidimensional HMBC da Substância 4

Fonte: Elaboração própria

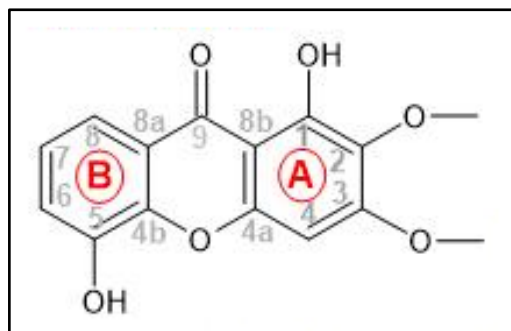
A análise de espectrometria de massas (ESI-MS/MS; Apêndice A - Figuras 48 a 51) corroborou a fórmula molecular  $C_{15}H_{12}O_6$  (MM = 288,27 g mol<sup>-1</sup>). O espectro em modo positivo exibiu o íon quase-molecular  $[M+H]^+$  em  $m/z$  289,11, com fragmentações sequenciais características: 289,11  $\rightarrow$  274,05 (-15 Da, CH<sub>3</sub>)  $\rightarrow$  256,02 (-18 Da, H<sub>2</sub>O)  $\rightarrow$  228,03 (-28 Da, CO)  $\rightarrow$  200,07 (-28 Da, CO). Essa sequência de perdas -CH<sub>3</sub>/-H<sub>2</sub>O/-CO/-CO é característica em xantonas metoxiladas (Figura 38).



**Figura 38.** Fragmentação de ESI-MS/MS da Substância 4

Fonte: Elaboração própria

A convergência dos dados de IV, RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C, HMQC, HMBC e ESI-MS/MS sustentou a identificação da Substância 4 como 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (Figura 39). O composto foi anteriormente relatado em *Senega paniculata* (Cristiano et al., 2003), *S. pulchella* (Missau et al., 2008) e *S. densiracemosa* (Tizziani, 2019), apresentando deslocamentos químicos concordantes com os obtidos neste estudo (Tabela 19). O mesmo perfil espectral foi detectado nas frações clorofórmica e acetato de etila (Apêndice A - Figuras 52 a 60), confirmando tratar-se da mesma substância isolada em ambas e reforçando a consistência da identificação estrutural.



**Figura 39.** Proposta estrutural para a Substância **4**, baseada na análise dos espectros de EM, IV e RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$

Fonte: Elaboração própria

**Tabela 19.** Sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e correlações bidimensionais (HMBC) da Substância **4** isolada das frações clorofórmica e acetato de etila, em comparação com dados da literatura

	SUBSTÂNCIA 4 (FRAÇÃO CLOROFÓRMICA)		SUBSTÂNCIA 4 (FRAÇÃO ACETATO DE ETILA)		Lit*	Lit**
Posição	$\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^1\text{H}$ (J, Hz)	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^1\text{H}$ (J, Hz)	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^1\text{H}$ (J, Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^1\text{H}$ (J, Hz)
1	153,01-	-	153,66	-	153,3	155,24
2	130,96-	-	131,62	-	132.2	132,82
3	159,85-	-	160,54	-	160.7	161,06
4	91,21; 6,80	103,06; 130,82; 153,1; 159,89;	91,89; 6,80	103,03; 131,62;	90.9; 6.32	91,67; 6,33
4a	153,1-	-	153,21	-	154.5	154,03
4b		-	146,74	-	145.2	148,37
5	144,88	-	145,52	-	147.8	146,91
6	120,37; 7,34, J = 7,8 e 1,5 Hz)	144,88; 123,99	121,02; 7,32	121,02; 146,74	121.2; 7,34	121,91; 7,56
7	123,99; 7,31( $\delta$ 7,32 ppm, J =	114,28; 120,28	124,73; 7,27	114,88; 145,55	124.0, 7.28	125,04; 7,31
8	114,17; 7,56 dd, J = 7,8 e	120,32; 144,88; 180,64	114,88; 7,58	121,01; 146,74	115.1; 7.80	115,75; 7,96
8a	120,28-	-	121,01-	-	-	122,26

8b	103,06-	-	103,72	-	104.3	105,02
9	180,64-	-	181,33	-	181.7	182,45
1'	56,36; 3,76	130,96-	57,04; 3,94	130,96	56.1; 3.98	56,83; 3,74
2'	59,87; 3,97	159,85-	60,03; 3,72	160,54	60.4; 3.73	61,1; 3,98
2-OH	12,78	103,06; 130,96; 153,10	-	-	13.43	12,83

Fonte: Elaboração própria e \*Cristiano, 2003; \*\* Tizziani, 2019.

## 4.5 Determinações de teores de fenólicos e flavonoides totais e ensaios antioxidantes

### 4.5.1 Extratos brutos e partições de *S. trichosperma* e *S. pulchella*

No presente trabalho, foram determinados os teores de compostos fenólicos e flavonoides totais, bem como, a atividade antioxidante avaliada pelos ensaios DPPH,  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e ABTS, para as seguintes amostras: extrato bruto (SPEB), frações hexânica (SPFH), clorofórmica (SPFC) e acetato de etila (SPFAC) de *Senega pulchella*; e extrato bruto (STEB), frações hexânica (STFH), clorofórmica (STFC) e acetato de etila (STFAC) de *Senega trichosperma*. Os valores obtidos para cada parâmetro encontram-se apresentados na Tabela 20, que reúne os resultados comparativos entre extratos e frações das duas espécies.

**Tabela 20.** Teores de fenólicos e flavonoides totais, ensaios antioxidantes do extrato bruto e frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila das espécies *S. pulchella* e *S. trichosperma*

Extrato/ Fração	Fenólicos (mg GAE·g <sup>-1</sup> )	Flavonoides (mg QE·g <sup>-1</sup> )	DPPH (CE <sub>50</sub> mg/mL)	$\beta$ -Caroteno (CL <sub>50</sub> mg/mL)	ABTS (CE <sub>50</sub> mg/mL)
STEB	63,28 ± 2,64 <sup>cd</sup>	36,27 ± 1,15 <sup>c</sup>	13,76 ± 0,20 <sup>f</sup>	6,37 ± 0,05 <sup>c</sup>	0,90 ± 0,01 <sup>f</sup>
SPEB	40,27 ± 0,37 <sup>c</sup>	35,60 ± 1,14 <sup>c</sup>	11,87 ± 0,09 <sup>e</sup>	5,16 ± 0,11 <sup>b</sup>	0,74 ± 0,01 <sup>e</sup>
STFH	18,67 ± 1,04 <sup>a</sup>	13,52 ± 0,24 <sup>a</sup>	9,63 ± 0,37 <sup>d</sup>	6,63 ± 0,09 <sup>c</sup>	1,58 ± 0,07 <sup>h</sup>
SPFH	36,10 ± 0,74 <sup>b</sup>	25,47 ± 2,26 <sup>b</sup>	17,50 ± 0,57 <sup>g</sup>	12,73 ± 0,07 <sup>d</sup>	1,00 ± 0,01 <sup>g</sup>
STFC	79,07 ± 0,21 <sup>e</sup>	58,67 ± 2,26 <sup>e</sup>	2,74 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,46 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,01 <sup>c</sup>
SPFC	58,87 ± 0,28 <sup>d</sup>	47,63 ± 6,23 <sup>d</sup>	4,05 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,59 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,01 <sup>d</sup>
STFAC	106,80 ± 4,56 <sup>f</sup>	53,82 ± 3,71 <sup>de</sup>	1,42 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,01 <sup>b</sup>
SPFAC	69,47 ± 0,54 <sup>e</sup>	56,87 ± 9,71 <sup>e</sup>	2,92 ± 0,15 <sup>b</sup>	0,31 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>a</sup>

Fonte: Elaboração própria

\*Os valores reportados são expressos como médias ± desvio padrão de 3 repetições (N=3). ANOVA. Amostras identificadas com mesma letra minúscula na mesma coluna de cada análise não apresentam diferença estatística pelo Teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

\*\*mg de ácido gálico/ g extrato ou fração/ mg de quercetina/ g de amostra

Os teores de fenólicos totais variaram entre extratos e frações das espécies avaliadas, com maior acúmulo nas frações acetato de etila: STFAC = 106,80 ± 4,56 mg GAE·g<sup>-1</sup> e SPFAC = 69,47 ± 0,54 mg GAE·g<sup>-1</sup>, seguidas pelas frações clorofórmicas (STFC > SPFC) e, por último, pelas frações hexânicas (SPFH > STFH). Um padrão semelhante foi observado para flavonoides, cujos teores máximos também ocorreram nas frações acetato (SPFAC = 56,87 ± 9,71 mg QE·g<sup>-1</sup>; STFAC = 53,82 ± 7,31 mg QE·g<sup>-1</sup>), com reduções progressivas nas frações

menos polares. Essa tendência confirma a afinidade desses metabólitos por solventes de maior polaridade, como o acetato de etila, que favorecem a extração de compostos com grupos hidroxila fenólicos (Eloff, 1998 ; Zhang et al., 2019).

Os ensaios antioxidantes corroboraram esses resultados. As menores  $CE_{50}$  (maior atividade) foram observadas nas frações acetato de etila — STFAC =  $1,42 \pm 0,10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e SPFAC =  $2,92 \pm 0,15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  no teste do DPPH; STFAC =  $0,27 \pm 0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e SPFAC =  $0,31 \pm 0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico; e STFAC =  $0,26 \pm 0,01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e SPFAC =  $0,22 \pm 0,01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  no ensaio ABTS. Frações clorofórmicas exibiram atividades intermediárias, enquanto as hexânicas e os extratos brutos foram menos ativas. A ANOVA revelou diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) entre extratos e frações, com coeficientes de variação inferiores a 6%, e o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) permitiu discriminar grupos estatisticamente distintos, confirmando a consistência dos resultados.

O comportamento observado — maiores teores de fenólicos e flavonoides associados a melhor capacidade antioxidante — reproduz padrões descritos em outras espécies do gênero *Senega*. Em *S. molluginifolia*, *S. campestris* e *S. longicaulis*, Venzke (2015) reportou o maior conteúdo fenólico na fração acetato (até  $334,26 \text{ mg GAE}\cdot\text{g}^{-1}$ ), acompanhando sua elevada inibição oxidativa (92,6%); Pereira (2017) encontrou teores máximos em frações etanólicas e acetato de *S. linoides* ( $77,09\text{--}85,10 \text{ mg GAE}\cdot\text{g}^{-1}$ ), também correlacionados à forte atividade antioxidante ( $CE_{50} = 5,87\text{--}17,21 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); e Tizziani (2019) verificou comportamento análogo em *S. altomontana*, *S. densiracemosa* e *S. lancifolia*, cujas frações acetato e etanólicas apresentaram altos teores de fenólicos (até  $119,1 \text{ mg GAE}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e forte capacidade de inibição da peroxidação lipídica (até 91%). Em *S. boliviensis*, Silva (2015) também relatou teores de flavonoides expressivos na fração acetato ( $55,9 \text{ mg QE}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

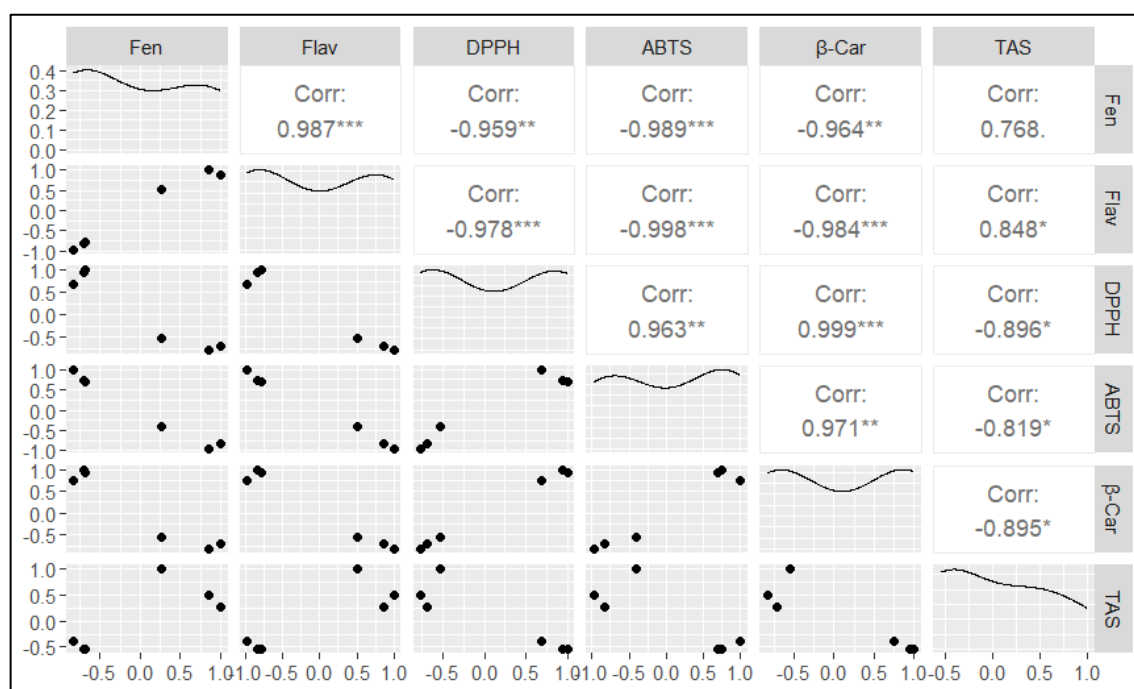
Essas semelhanças reforçam que a polaridade do solvente é determinante na extração de compostos antioxidantes e na intensidade da resposta bioativa. Embora os três métodos antioxidantes avaliem mecanismos distintos — transferência de elétron (DPPH, ABTS) e inibição da oxidação lipídica ( $\beta$ -caroteno/ácido linoleico) —, observou-se tendência convergente para as frações acetato. Entretanto, diferenças entre ensaios são esperadas, pois antioxidantes lipofílicos apresentam maior eficiência no sistema  $\beta$ -caroteno, enquanto compostos hidrossolúveis respondem melhor nos ensaios DPPH e ABTS (Kumaran et al., 2007; Sampaio, 2024; Silva, 2020).

Por fim, a comparação entre as duas espécies indica que *S. trichosperma* apresenta maior potencial antioxidante global, associado a teores mais altos de compostos fenólicos, embora *S. pulchella* demonstre desempenho relevante nas frações mais polares. As variações interespecies

observadas podem refletir diferenças ambientais (irradiação, disponibilidade hídrica, nutrientes e estação de coleta), que modulam o metabolismo de fenilpropanoide e, conseqüentemente, a biossíntese desses metabólitos (Taiz & Zeiger, 2013).

#### 4.5.1.1 Correlação entre teores de fenólicos e flavonoides totais e atividade antioxidante

Com o intuito de avaliar a relação entre o conteúdo de compostos bioativos e a atividade antioxidante obtida pelos diferentes ensaios, aplicou-se a análise de correlação de Pearson (Figura 40). Esse tratamento estatístico permite quantificar a intensidade e a direção da associação linear entre duas variáveis, com valores de correlação ( $r$ ) variando de  $-1$  a  $+1$ . Correlações negativas indicam relação inversa, enquanto valores positivos apontam relação direta; quanto mais próximos dos extremos, mais forte é a associação. Os resultados revelaram correlações significativas entre os teores de fenólicos totais, flavonoides totais e os parâmetros de atividade antioxidante (DPPH, ABTS e  $\beta$ -caroteno).



**Figura 40.** Correlação de Pearson entre Conteúdos de fenólicos e flavonoides totais, ensaios antioxidantes e letalidade frente à *Artemia salina* do extrato bruto e frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila das espécies *S. pulchella* e *S. trichosperma*

Fonte: Elaboração própria

\*Fen.= fenólicos totais. Flav= flavonoides totais. DPPH=sequestro de radicais livres. ABTS=atividade antirradicalar ABTS.  $\beta$ -Car. = inibição da auto-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. TAS= letalidade frente à *Artemia salina*. \*\*\*  $p \leq 0,001$  \*\*  $p \leq 0,01$  \*  $p \leq 0,05$ .  $p \leq 0,1$ .

Os compostos fenólicos apresentaram forte associação inversa com os ensaios antioxidantes, evidenciando que maiores concentrações desses metabólitos resultaram em menores valores de  $CE_{50}$ , indicando maior eficiência antioxidante. As correlações mais expressivas foram observadas entre fenólicos e DPPH ( $r = -0,959$ ;  $p \leq 0,01$ ) e entre fenólicos e ABTS ( $r = -0,989$ ;  $p \leq 0,001$ ). Os flavonoides mostraram comportamento semelhante, com correlações negativas e altamente significativas frente aos mesmos ensaios ( $r = -0,978$ ;  $p \leq 0,001$  para DPPH e  $r = -0,998$ ;  $p \leq 0,001$  para ABTS). Tais resultados confirmam que o aumento do teor desses compostos bioativos está associado a maior capacidade antioxidante das amostras.

Embora o ensaio de letalidade frente à *Artemia salina* (LAS) também tenha sido incluído na matriz de correlação de Pearson com finalidade exploratória, sua discussão detalhada encontra-se no item 4.6.1 (p. 96), que aborda os ensaios biológicos gerais.

De modo geral, a forte associação inversa entre os teores de fenólicos/flavonoides e as respostas obtidas nos ensaios antioxidantes corrobora os resultados obtidos experimentalmente (Tabela 20) e está em consonância com estudos prévios em espécies do gênero *Senega*, que relatam comportamento semelhante (Venzke, 2015; Pereira, 2017; Tizziani, 2019). Altos teores desses metabólitos estão diretamente relacionados à capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio, reforçando o papel desses compostos na proteção contra o estresse oxidativo (Floegel et al., 2011; Shahidi et al., 2010).

Assim, as análises estatísticas sustentam a estreita relação entre composição química e potencial antioxidante das espécies estudadas, destacando *S. trichosperma* como a que apresentou, de modo geral, os melhores resultados, embora *S. pulchella* também tenha demonstrado desempenho expressivo em alguns parâmetros.

#### 4.5.2 Extratos brutos de *S. pulchella*

Os conteúdos de compostos fenólicos e flavonoides, bem como a atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP, foram determinados para os extratos brutos de *S. pulchella* obtidos por diferentes técnicas de extração: (i) maceração metanólica (SPMM); (ii) maceração etanólica (SPME); (iii) Soxhlet com metanol (SPSOX); (iv) ultrassom assistido com metanol (SPULT).

Os resultados obtidos para cada parâmetro encontram-se apresentados na Tabela 21, que reúne a comparação entre os métodos de extração empregados. A análise estatística (ANOVA e teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ) revelou diferenças significativas entre os métodos para todas as

variáveis avaliadas. O coeficiente de variação (CV%) manteve-se inferior a 10% em todos os testes, indicando precisão experimental e reprodutibilidade dos dados.

**Tabela 21.** Conteúdos de fenólicos e flavonoides totais, ensaios antioxidantes dos extratos brutos de *S. pulchella*

EXTRATO	FENÓLICOS (mg GAE. g <sup>-1</sup> )	FLAVONOIDES (mg QE. g <sup>-1</sup> )	DPPH CE <sub>50</sub> (mg/mL)	ABTS CE <sub>50</sub> (mg/mL)	FRAP (mg AA. g <sup>-1</sup> )
SPMM	34,4±1,66 <sup>ab</sup>	3,32±0,22 <sup>a</sup>	0,89±0,08 <sup>b</sup>	0,50±0,01 <sup>b</sup>	16,48±0,25 <sup>b</sup>
SPME	79,8±3,24 <sup>c</sup>	8,14±0,20 <sup>b</sup>	10,39±0,06 <sup>ab</sup>	0,17±0,01 <sup>a</sup>	18,41±0,65 <sup>c</sup>
SPSOX	40,2±1,86 <sup>b</sup>	4,76±0,13 <sup>ab</sup>	10,09±0,20 <sup>a</sup>	0,61±0,03 <sup>c</sup>	23,84±0,32 <sup>d</sup>
SPULT	29,8±1,27 <sup>a</sup>	2,95±0,10 <sup>a</sup>	12,10±0,46 <sup>c</sup>	0,94±0,08 <sup>d</sup>	14,55±0,25 <sup>a</sup>

Fonte: Elaboração própria

\*Os valores reportados são expressos como médias ± desvio padrão de 3 repetições (N=3). ANOVA. Amostras identificadas com mesma letra minúscula na mesma coluna de cada análise não apresentam diferença estatística pelo Teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

\*\* mg de ácido gálico/ g extrato ou fração/ mg de quercetina/ g de amostra/ mg de ácido ascórbico/ g extrato ou fração.

O extrato obtido por maceração etanólica (SPME) apresentou o maior teor de fenólicos ( $79,8 \pm 3,24$  mg GAE·g<sup>-1</sup>) e de flavonoides ( $8,14 \pm 0,20$  mg QE·g<sup>-1</sup>), além da melhor atividade antioxidante pelo método ABTS (CE<sub>50</sub> =  $0,17 \pm 0,01$  mg/mL). Esse desempenho evidencia a eficiência do etanol como solvente de extração, cuja polaridade e capacidade de solubilização permitem recuperar simultaneamente compostos de natureza polar e apolar, favorecendo a extração de polifenóis e outros metabólitos bioativos (Lee et al., 2024).

No teste DPPH, as menores médias de CE<sub>50</sub> que correspondem a maior atividade sequestrante de radicais, foram observadas para SPME ( $10,39 \pm 0,06$  mg/mL) e SPSOX ( $10,09 \pm 0,20$  mg/mL), as quais não diferiram estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ), enquanto SPULT apresentou a menor eficiência antioxidante ( $12,10 \pm 0,46$  mg/mL). No ensaio FRAP, o extrato SPSOX apresentou o melhor desempenho redutor ( $23,84 \pm 0,32$  mg AA·g<sup>-1</sup>), mesmo com teores intermediários de fenólicos e flavonoides, o que indica que compostos com potencial redutor podem estar sendo extraídos de modo mais eficiente sob condições térmicas do método Soxhlet.

O extrato SPULT, por outro lado, apresentou o menor teor de fenólicos ( $29,8 \pm 1,27$  mg GAE·g<sup>-1</sup>) e a menor capacidade antioxidante tanto no DPPH quanto no ABTS, sugerindo que o tempo reduzido e a energia ultrassônica aplicada podem não ter sido suficientes para a completa liberação dos compostos ativos nas condições empregadas.

De modo geral, os resultados evidenciaram uma associação estatisticamente significativa entre os teores de compostos fenólicos e flavonoides e a capacidade antioxidante medida pelo ensaio FRAP, em que os extratos com maiores concentrações desses metabólitos apresentaram também os maiores valores médios de poder redutor. Por outro lado, observou-se uma tendência inversa nos testes DPPH e ABTS, nos quais os extratos com maior conteúdo de fenólicos e flavonoides exibiram menores valores médios de  $CE_{50}$ , o que indica maior eficiência na neutralização de radicais livres. Esses comportamentos confirmam que as diferenças detectadas pelas análises de variância e agrupamentos pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) refletem a influência direta dos teores de compostos bioativos sobre a atividade antioxidante dos extratos avaliados.

Esses resultados estão em conformidade com os padrões descritos na literatura para extratos vegetais ricos em polifenóis (Floegel et al., 2011; Shahidi et al., 2010), e reforçam o papel dos flavonoides e compostos fenólicos como os principais contribuintes da atividade antioxidante em *S. pulchella*.

Além disso, as diferenças entre os métodos de extração podem ser atribuídas às distintas interações entre solvente e matriz vegetal, às condições de temperatura e tempo de extração, e à natureza dos compostos bioativos (Azmir et al., 2013; Smith, 2003). O método de maceração etanólica mostrou-se mais eficiente para compostos fenólicos polares, enquanto o Soxhlet destacou-se para substâncias termicamente estáveis de caráter redutor.

A literatura também relata que métodos não convencionais, como ultrassom e extração dinâmico-rápida (RSLDE), podem aumentar a difusão dos solventes e preservar compostos sensíveis ao calor (Palmieri et al., 2020; Kalinowska et al., 2020), embora sua eficiência dependa fortemente da matriz e do solvente empregado. Assim, a maceração etanólica demonstrou-se particularmente adequada para *S. pulchella*, proporcionando extração seletiva e rendimento superior de metabólitos bioativos associados à atividade antioxidante.

## **4.6 Ensaio biológicos gerais**

### **4.6.1 Letalidade frente à *Artemia salina***

O ensaio de letalidade frente à *Artemia salina* é amplamente utilizado como triagem preliminar para avaliar a toxicidade geral de extratos e substâncias naturais, sendo considerado um bom indicador de potencial citotóxico (Meyer et al., 1982; Clarkson et al., 2004).

No presente estudo, os valores de  $CL_{50}$  para os extratos brutos e frações de *Senega pulchella* e *S. trichosperma* variaram de 0,51 a 11,99  $mg \cdot mL^{-1}$ , conforme apresentado na Tabela 22. As frações hexânicas de ambas as espécies apresentaram as menores  $CL_{50}$  (SPFH = 0,51  $mg \cdot mL^{-1}$ ; STFH = 0,72  $mg \cdot mL^{-1}$ ), indicando maior toxicidade, seguidas pelos extratos brutos (SPEB = 0,79  $mg \cdot mL^{-1}$ ; STEB = 0,82  $mg \cdot mL^{-1}$ ) e pelas frações acetato de etila (SPFAC = 1,63  $mg \cdot mL^{-1}$ ; STFAC = 1,64  $mg \cdot mL^{-1}$ ). As frações clorofórmicas, por sua vez, exibiram os maiores valores de  $CL_{50}$  (SPFC = 11,99  $mg \cdot mL^{-1}$ ; STFC = 9,54  $mg \cdot mL^{-1}$ ), indicando baixa toxicidade nas condições testadas.

**Tabela 22.** Letalidade frente a *Artemia salina*, expressa em  $CL_{50}$  ( $mg \cdot mL^{-1}$ ) para extratos e frações de *S. pulchella* e *S. trichosperma*

	EB	FH	FC	FA	EB	FH	FC	FA
	<i>S. pulchella</i>				<i>S. trichosperma</i>			
<b>Log (concentração)</b>	-0,099	-0,287	1,00	0,215	-0,085	-0,142	0,980	0,215
<b><math>CL_{50}</math> (<math>mg \cdot mL^{-1}</math>)</b>	0,79 <sup>a</sup>	0,51 <sup>a</sup>	11,99 <sup>c</sup>	1,63 <sup>b</sup>	0,82 <sup>a</sup>	0,72 <sup>a</sup>	9,54 <sup>c</sup>	1,64 <sup>b</sup>

\*ANOVA. Amostras identificadas com mesma letra minúscula na mesma linha não apresentam diferença estatística pelo Teste Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

De acordo com os critérios de Clarkson et al. (2004), amostras com  $CL_{50}$  superior a 1,0  $mg \cdot mL^{-1}$  são consideradas não tóxicas; entre 0,5 e 1,0  $mg \cdot mL^{-1}$ , de baixa toxicidade; entre 0,1 e 0,5  $mg \cdot mL^{-1}$ , moderadamente tóxicas; e abaixo de 0,1  $mg \cdot mL^{-1}$ , altamente tóxicas. Com base nessa classificação, as frações clorofórmicas e acetato de ambas as espécies apresentaram  $CL_{50} > 1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ , sendo enquadradas como não tóxicas, enquanto os extratos brutos e frações hexânicas exibiram valores entre 0,51 - 0,82  $mg \cdot mL^{-1}$ , caracterizando-se como amostras de baixa toxicidade.

A análise estatística (teste de Scott-Knott,  $p \leq 0,05$ ) indicou ausência de diferença significativa entre os extratos brutos e as frações hexânicas dentro de cada espécie, reforçando a semelhança no comportamento dessas amostras. Já as frações clorofórmicas e acetato apresentaram diferenças estatisticamente significativas, com redução acentuada na toxicidade, o que confirma o papel da polaridade do solvente na partição dos compostos bioativos.

De modo geral, os resultados obtidos indicam que, embora as frações menos polares de *S. pulchella* e *S. trichosperma* concentrem os constituintes mais ativos frente à *Artemia salina*, a toxicidade observada permaneceu dentro da faixa de baixa a não tóxica, conforme os critérios de Clarkson et al. (2004), reforçando o perfil de segurança biológica das amostras. Essa tendência, associada às correlações positivas entre os teores de compostos fenólicos e

flavonoides e a atividade antioxidante, sugere que esses metabólitos secundários podem contribuir para efeitos biológicos complementares. A análise de correlação de Pearson aplicada aos dados deste ensaio revelou uma relação direta entre os teores de fenólicos e flavonoides totais e a letalidade observada, embora com menor magnitude em comparação às correlações obtidas para os ensaios antioxidantes. Foram determinados coeficientes positivos moderados ( $r = 0,768$  para fenólicos e  $r = 0,848$  para flavonoides), com significância estatística entre  $p \leq 0,1$  e  $p \leq 0,05$ , indicando que amostras mais ricas nesses compostos apresentaram maior bioatividade no teste de letalidade.

Estudos prévios corroboram esse padrão. Pereira (2017), ao avaliar *S. linoides*, relatou valores de  $CL_{50}$  superiores a  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  para o extrato bruto e respectivas frações, sugerindo baixa toxicidade geral da espécie. Em contrapartida, Silva (2015) observou que as frações hexânica e clorofórmica de *S. boliviensis* apresentaram maior atividade letal frente à *Artemia salina* — isto é, menores valores de  $CL_{50}$ , indicando maior capacidade de causar mortalidade no microcrustáceo. O extrato bruto e a fração acetato, por sua vez, mostraram menor atividade letal, o que reforça a influência da polaridade do solvente sobre o perfil de toxicidade. Resultados semelhantes foram descritos por Montanher, Pizzolatti e Brighente (2003) e por Missau (2008) para *S. paniculata* e *S. sabulosa*, nas quais as frações hexânica e diclorometano, de baixa polaridade, apresentaram maior efeito letal, com valores de  $CL_{50}$  variando entre  $0,56$  e  $0,78 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Em síntese, as espécies estudadas demonstram baixa toxicidade global, compatível com seu potencial de aplicação em estudos biológicos, ao mesmo tempo em que exibem perfis químicos capazes de justificar as respostas observadas nos ensaios de letalidade. Esses resultados fornecem suporte para a continuidade das investigações citotóxicas direcionadas, especialmente sobre as frações de menor polaridade, que mostraram comportamento mais expressivo neste teste.

#### 4.6.2 Atividade antimicrobiana

##### 4.6.2.1 Atividade antimicrobiana de extratos e frações de *S. pulchella* e *S. trichosperma* e de extratos de *S. pulchella* obtidos por diferentes métodos e solventes de extração

O extrato bruto obtido por maceração metanólica de *S. pulchella* (SPMM) apresentou atividade antimicrobiana detectável, inibindo o crescimento das cepas bacterianas e fúngicas testadas, com concentração inibitória mínima (CIM) de  $1024 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Tabela 23). Esse

resultado indica uma atividade biológica moderada, segundo parâmetros de classificação adotados no estudo.

Nas demais amostras — compreendendo os extratos obtidos por maceração etanólica, Soxhlet e ultrassom (*S. pulchella*), bem como as frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila (*S. trichosperma* e *S. pulchella*) — não foi detectada atividade antimicrobiana em concentrações  $\leq 1024 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , o que sugere ausência de efeito inibitório relevante nas condições experimentais avaliadas.

**Tabela 23.** Resultados da avaliação da CIM, CBM e CFM ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) das amostras de *S. trichosperma* e *S. pulchella* contra espécies microbianas-Técnica de Microdiluição

Prrodutos ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	<i>S. aureus</i> ATCC-25923	<i>S. epidermidis</i> ATCC-12228	<i>P. aeruginosa</i> ATCC-9097	<i>P. mirabilis</i> ATCC-25933	<i>C. albicans</i> ATCC-90028	<i>C. albicans</i> LM-65	<i>C. tropicalis</i> ATCC-750	<i>C. tropicalis</i> LM-14	<i>A. flavus</i> ATCC-4603	<i>P. citrinum</i> ATCC-4001.	CBM/CFM
<b>SPMM</b>	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	X
Controle: Meio de cultura	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Controle: Micro-organismo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Controle: gentamicina	128	128	256	256	X	X	X	X	X	X	
Controle: Fluconazol	X	X	X	X	128	128	128	128	256	256	

Fonte: Elaboração própria

\*(+): Crescimento do micro-organismo (-): Não houve crescimento microbiano; (x): Não se aplica

Resultados semelhantes foram observados em outros estudos com o gênero *Senega*. Lopes (2022) avaliou a atividade antibacteriana de extratos de *S. sabulosa*, *S. brasiliensis*, *S. linoides*, *S. altomontana*, *S. pulchella*, *S. campestris*, *S. lancifolia* e *S. densiracemosa* frente às bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, empregando o método de diluição seriada em microplacas. A autora observou maior atividade para *S. altomontana* (caule) e *S. sabulosa* (caule) contra *S. aureus*, enquanto os extratos de *S. pulchella* e *S. sabulosa* (flores) apresentaram atividade fraca frente a *P. aeruginosa*. Para *E. coli*, o extrato floral de *S. sabulosa* demonstrou atividade moderada e o de *S. altomontana* atividade fraca. A pesquisadora atribuiu essas diferenças ao perfil fitoquímico diverso entre espécies e partes

vegetais, ressaltando a presença de ácido salicílico, salicilato de metila, rutina, apigenina, quercetina e xantonas, compostos conhecidos por contribuir para a atividade antimicrobiana em espécies de *Senega*.

De modo complementar, Tizziani (2019) avaliou a atividade antibacteriana e antifúngica de extratos brutos e frações de *S. altomontana*, *S. densiracemosa* e *S. lancifolia* em concentrações de 1000 a 7,81  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . O autor verificou que as três espécies foram inativas contra *E. coli*, mas apresentaram atividade fraca a moderada frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa*, sobretudo nas frações acetato de etila. O extrato bruto de *S. altomontana* destacou-se por apresentar CIM = 125  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  contra *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans*, valores considerados ativos e próximos ao limite de alta potência, segundo o critério de Ríos & Recio (2005). Esses achados reforçam que a polaridade intermediária do solvente favorece a extração de metabólitos com potencial antimicrobiano.

De forma convergente, Zeleke et al. (2024) demonstraram que o extrato etanólico de *S. sadebeckiana* Gürke apresentou atividade antibacteriana significativa frente a *S. aureus* e *S. pyrogen*, com CIM de 1,67  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e 0,98  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente, valores que se aproximam dos obtidos para o extrato metanólico de *S. pulchella* neste estudo. Os autores atribuem a atividade observada à alta diversidade de metabólitos secundários nas espécies do gênero, incluindo xantonas, cumarinas e derivados fenólicos metoxilados, compostos frequentemente associados à ação bactericida mediada por mecanismos oxidativos.

Esses resultados, aliados aos achados de Tizziani (2019) e Lopes (2022), reforçam que o gênero *Senega* apresenta potencial antimicrobiano variável, influenciado por fatores como espécie, parte vegetal, solvente e método de extração. A ausência de atividade detectável nas demais amostras de *S. pulchella* e *S. trichosperma* em concentrações  $\leq 1024 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  indica, contudo, que a ação antimicrobiana não constitui característica marcante dessas espécies, podendo ser mais expressiva frente a outros modelos biológicos, como demonstrado nos ensaios antioxidantes, anticolinesterásicos e citotóxicos conduzidos neste trabalho.

#### 4.6.2.2 Atividade antimicrobiana das Substâncias 2, 3 e 4

Os ensaios de atividade antimicrobiana demonstraram que, entre as amostras testadas, as Substâncias 2 e 3, isoladas de *Senega trichosperma*, exibiram efeito inibitório sobre o crescimento de aproximadamente 75 % das espécies microbianas avaliadas, apresentando Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 512  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Tabela 24). Esses valores indicam atividade antimicrobiana moderada, segundo os critérios de Holetz et al. (2002); Sartoratto et

al. (2004); Houghton et al. (2007). Em contrapartida, a Substância **4** isolada de *Senega pulchella*, não apresentou efeito significativo nas concentrações testadas, sendo as cepas consideradas resistentes.

**Tabela 24.** Resultados da média da avaliação (n=3) da Concentração Inibitória Mínima/CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) das Substâncias 2, 3 e 4 contra espécies microbianas-Técnica de Microdiluição

Extratos ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>S. aureus</i> ATCC-25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC-25853	<i>C. albicans</i> ATCC-76485	<i>C. albicans</i> LM-65	<i>C. tropicalis</i> ATCC-750	<i>C. tropicalis</i> LM-14	<i>T. rubrum</i> ATCC-28188	<i>T. rubrum</i> LM-150	<i>A. flavus</i> ATCC-4603	<i>A. flavus</i> LM-248	<i>P. citrinum</i> ATCC-28752	<i>P. citrinum</i> LM-74
<b>Substância 2</b>	512	+	512	512	512	512	512	512	512	512	+	+
<b>Substância 3</b>	512	+	512	512	512	512	512	512	512	512	+	+
<b>Substância 4</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle: Micro-organismo	+	+	+		+	+	+	+	+	+		
Controle: gentamicina	128	128	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Controle: Fluconazol	X	X	128	128	128	128	128	128	256	256	1024	1024

Fonte: Elaboração própria

(+): Crescimento do micro-organismo (-): Não houve crescimento microbiano; (X): Não se aplica

A Substância **2** (1,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':3,2) - xantona) e a Substância **4**, ambas xantonas oxigenadas, representam esqueletos estruturais distintas dentro do gênero *Senega*: a primeira, pirano-substituída e mais lipofílica, e a segunda, dimetoxilada e mais polar. Essa diferença estrutural explica, em parte, a variação observada no potencial antimicrobiano. Xantonas pirânicas ou preniladas, como a Substância **2**, têm sido amplamente associadas a efeitos antimicrobianos, antioxidantes e citotóxicos, em virtude de sua capacidade de interagir com membranas celulares e causar desestabilização oxidativa (Araújo et al., 2019).

A Substância **3** (8-(3-metil-2-butenil) - benzopirano-2-ona ou osthol), uma cumarina prenilada isolada de *S. trichosperma*, também apresentou atividade antimicrobiana moderada (CIM =  $512 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Cumarinas com prenilação em C-6 ou C-8, são reconhecidas por seu efeito antimicrobiano e antifúngico, uma vez que a prenilação aumenta a lipofilicidade e melhora a interação com membranas e alvos enzimáticos microbianos (Tan et al., 2019). Assim, o comportamento observado para a Substância **3** reforça que a presença de cadeias isoprenoides é determinante para a bioatividade dentro dessa classe.

Do ponto de vista químico e biológico, este trabalho constitui o primeiro registro da atividade antimicrobiana para compostos isolados de *Senega trichosperma* e *S. pulchella*. As xantonas pirânicas e as cumarinas preniladas de *S. trichosperma* mostraram atividade moderada, enquanto a xantona dimetoxilada de *S. pulchella* apresentou inatividade — comportamento coerente com a literatura, que descreve maior eficácia antimicrobiana em derivados menos oxigenados e mais hidrofóbicos (Liu, Shen e Zhu, 2021).

De forma geral, os resultados reforçam a relevância do gênero *Senega* como fonte de metabólitos bioativos, cujas atividades variam conforme a estrutura química, polaridade e presença de substituições preniladas. As observações aqui relatadas contribuem para ampliar o entendimento sobre o potencial farmacológico das xantonas e cumarinas naturais desse grupo, sobretudo no contexto de novos agentes antimicrobianos de origem vegetal.

#### 4.6.3 Atividade citotóxica

Este estudo avaliou a atividade citotóxica de extratos vegetais brutos de *Senega pulchella* obtidos por diferentes métodos de extração (MM, SOX, ME e ULT) frente às linhagens celulares tumorais (K562 e PC3) e não tumorais (HUVEC e McCoy), com o objetivo de identificar potenciais candidatos com seletividade antitumoral. Os valores de  $CI_{50}$  apresentados na Tabela 25, foram determinados por meio de ensaio colorimétrico de viabilidade celular. O índice de seletividade (IS) (Tabela 26) foi calculado para estimar a toxicidade diferencial entre células tumorais e normais.

**Tabela 25.** Valores de  $CI_{50}$  encontrados para as linhagens celulares testadas nos tratamentos com extratos brutos de *Senega pulchella* obtidos pelos métodos de extração: i) Maceração Metanólica (SPMM); ii) Maceração Etanólica (SPME); iii) Soxlhet (SPSOX); iv) Ultrassom (SPULT)

	Células Tumorais		Células Não-Tumorais	
	Leucemia (K562) ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Próstata (PC3) ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Endotelial (HUVEC) ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Fibroblástica (McCoy) ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
<b>SPMM</b>	271,4	330,1	432,1	604,7
<b>SPSOX</b>	240,8	388,4	446,3	552,8
<b>SPME</b>	389,2	466,7	546,9	601,2
<b>SPULT</b>	251,4	369,8	437,3	541,8

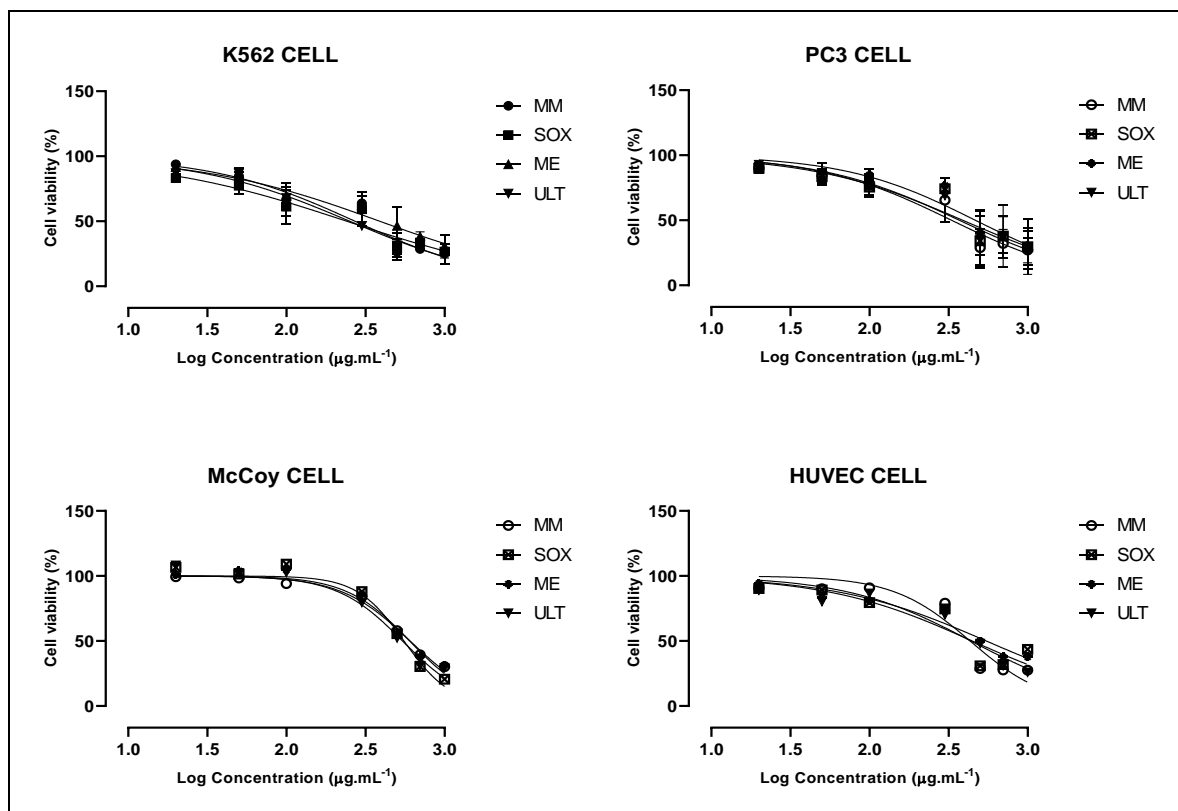
Fonte: Elaboração própria

**Tabela 26.** Seletividade da citotoxicidade dos extratos brutos de *Senega pulchella* para células tumorais (K562 e PC3), em comparação com células não tumorais (HUVEC e McCoy)

	Índice de seletividade		Índice de seletividade	
	HUVEC/K562	McCoy/K562	HUVEC/PC3	McCoy/PC3
<b>SPMM</b>	1,6	2,2	1,3	1,8
<b>SPSOX</b>	1,9	2,3	1,1	1,4
<b>SPME</b>	1,4	1,5	1,2	1,3
<b>SPULT</b>	1,7	2,2	1,2	1,5

Fonte: Elaboração própria

Os extratos SOX, MM e ULT apresentaram maior citotoxicidade frente à linhagem K562 ( $CI_{50} = 240,8, 271,4$  e  $251,4 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente), acompanhada de índices de seletividade superiores a 2 frente à linhagem de fibroblastos McCoy. Os mesmos extratos também demonstraram toxicidade moderada frente à linhagem PC3, embora com menor seletividade. O extrato ME apresentou os maiores valores de  $CI_{50}$  e os menores índices de seletividade, sendo o menos promissor do grupo (Figura 41). Um agente anticâncer interessante deve ter um efeito mais citotóxico em linhagens de células cancerígenas e menos efeito em linhagens de células não cancerígenas. Valores de  $IS \geq 2$  são geralmente considerados indicativos significativos de seletividade, conforme descrito pelo *National Cancer Institute*, EUA (NCI, Bethesda, MD, EUA), mostrando que o composto é pelo menos duas vezes mais tóxico para células tumorais do que para células normais. Diante do exposto, a seletividade preliminar observada para os extratos metanólicos MM e SOX é encorajadora para pesquisas futuras na busca de uma elucidação completa de ações anticâncer com potencial terapêutico direcionado especialmente a leucemia mieloide crônica humana.



**Figura 41.** Porcentagem de viabilidade celular das linhagens K562 (leucemia), PC3 (próstata), McCoy (fibroblasto murino) e HUVEC (células endoteliais humanas) após 48 h de tratamento com diferentes frações (MM, SOX, ME e ULT).

Fonte: Elaboração própria

É reconhecido que a escolha do solvente usado em uma extração define o perfil químico do extrato e, potencialmente, influencia seus efeitos citotóxicos. Segundo Canga et al. (2022), diferentes solventes foram usados nos estudos avaliados, especialmente metanol, água, etanol e hexano; os resultados variaram entre as pesquisas. A água, mesmo tratando-se do solvente preferido em usos tradicionais, foi a menos ativa. O metanol foi o solvente mais utilizado pela maioria dos autores pesquisados e, em alguns casos, se mostrou como solvente mais ativo na extração de bioativos mais efetivos, em comparação com outros extratos como acetato de etila ou extratos aquosos. Essas características, entretanto, variam de acordo com o extrato vegetal usado.

O estudo desenvolvido por Naidoo et al. (2017) demonstra que a viabilidade das células leucêmicas THP-1 não foi significativamente alterada pelo extrato etanólico da folha de *C. asiatica* (0,2–0,8 mg/mL) em comparação ao controle. A polaridade do solvente desempenha um papel vital na adaptação do processo de extração para recuperar a quantidade e a diversidade máximas de compostos bioativos. Nesse estudo, o solvente mais polar, metanol, apresentou extratos com maior eficiência para linhagens testadas, em especial nas linhagens leucêmicas,

fator que pode estar atrelado ao efeito sinérgico promovido pelos compostos extraídos nessa polaridade para espécie estudada. De modo geral, os resultados de atividade citotóxica entre os extratos obtidos a partir dos solventes citados, ou combinação entre eles, variaram entre os estudos.

Embora diversos compostos isolados de plantas sejam amplamente investigados por sua atividade antitumoral, é reconhecido que os efeitos terapêuticos das plantas frequentemente resultam da interação complexa entre os múltiplos constituintes presentes no extrato bruto. Essa combinação pode gerar efeitos aditivos, sinérgicos ou até antagonistas, o que geralmente não ocorre com compostos isolados (Karna et al., 2012; Liu, 2003). Os efeitos anticancerígenos das plantas estão relacionados à supressão de enzimas estimulantes do câncer, ao reparo do DNA, à estimulação da produção de enzimas antitumorais nas células, ao aumento da imunidade corporal e à indução de efeitos antioxidantes (Kooti et al., 2017). No entanto, são os metabólitos secundários oriundos do extrato vegetal e sua variabilidade de composição química que determinarão suas propriedades biológicas.

Os resultados expressos nas Tabelas 25, 26 e Figura 41 indicam que os extratos metanólicos SOX, MM e ULT mostraram uma maior diminuição da viabilidade celular de células cancerígenas K562 e PC3, especialmente contra células leucêmicas, justificando a importância de estudos adicionais de fracionamento e caracterização de compostos ativos. Espécies do gênero também foram avaliadas quanto à atividade citotóxica no estudo conduzido por Tizziani et al. (2017). Os autores observaram que *S. densiracemosa*, *S. campestris* e *S. molluginifolia* inibiram em mais de 50% a proliferação de células tumorais, ao mesmo tempo em que apresentaram baixa citotoxicidade frente a células não tumorais. Esse perfil de seletividade reforça o potencial do gênero *Senega* como fonte promissora de compostos candidatos ao desenvolvimento de fármacos quimioterápicos.

#### 4.6.4. Atividade Anticolinesterásica *in vitro*

##### 4.6.4.1 Extratos brutos de *S. pulchella*

Algumas doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer, que levam a um declínio progressivo na memória, são causadas pelo déficit dos níveis de acetilcolina (ACh), que sofre hidrólise por meio das enzimas AChE e BuChE. No entanto, inibidores para as enzimas citadas são reportados como principais responsáveis para manter os níveis adequados de ACh (Li et al., 2014).

Estudos apontam alguns metabólitos secundários com potencial atividade inibidora de acetilcolinesterase (Mukherjee et al., 2007). Barbosa Filho et al. (2006) apresentam em sua pesquisa de revisão as classes de compostos que têm sido isolados e identificados em estudos de atividade anticolinesterásica, em que a maioria pertence à classe dos alcalóides, seguido dos monoterpenos, cumarinas, triterpenos, flavonoides, entre outros.

Segundo Vinutha et al. (2007), os extratos que apresentam inibição menor do que 30% podem ser considerados inativos ou com baixa atividade, os que apresentam inibição entre 30 e 50% podem ser considerados medianamente ativos e, acima de 50%, são considerados potentes inibidores.

A atividade anticolinesterásica dos extratos brutos de *Senega pulchella*, obtidos por diferentes métodos de extração (SPME, SPMM, SPSOX e SPUH) foi avaliada frente às enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE) na concentração de 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Tabela 27). Destacou-se a influência do solvente e da técnica empregada sobre a composição química e, conseqüentemente, sobre a atividade biológica. Os resultados demonstraram que todos os extratos apresentaram capacidade de inibição enzimática, variando de moderada à alta atividade frente à AChE (41,98% a 66,20%) e de baixa à moderada frente à BuChE (27,92% a 48,65%). O extrato obtido por maceração com etanol (SPME) apresentou a maior atividade inibitória da AChE (66,2%) e também se destacou frente à BuChE (43,51%), sugerindo que o etanol favoreceu a extração de compostos ativos com afinidade por ambas as enzimas.

Os extratos obtidos por maceração com metanol (SPMM) e soxhlet com metanol (SPSOX) apresentaram atividade intermediária frente à AChE (56,74% e 56,78%, respectivamente). Em relação a inibição da butirilcolinesterase (BuChE), por sua vez, os extratos exibiram um perfil distinto de atividade em que o extrato obtido por ultrassom (SPULT) demonstrou maior inibição (48,65%), seguido por SPME (43,51%), SPMM (34,69%) e SPSOX (27,92%). Essa variação pode refletir uma composição diferenciada de compostos ativos, já que a BuChE é uma enzima capaz de se ligar e/ou hidrolisar uma gama diversa de compostos, ao contrário da enzima homóloga altamente seletiva, AChE, e pode ser sensível a um espectro mais amplo de moléculas bioativas (Lockridge, 2015).

**Tabela 27.** Inibição de AChE e BuChE pelos extratos brutos de *S. pulchella*

<b>Amostra (500 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Inibição AChE (%)</b>	<b>Inibição BuChE (%)</b>
SPULT	41,98	48,65
SPME	66,2	43,51
SPMM	56,74	34,69
SPSOX	56,78	27,92

Fonte: Elaboração própria

No estudo desenvolvido por Tizziani (2019), o bioensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase foi realizado para as espécies *Senega Altomontana*, *S. lancifolia* e *S. densiracemosa*, conforme o método descrito por Rhee et al., (2001). Os resultados obtidos para extrato bruto apontaram a *S. altomontana* com os maiores valores de inibição enzimática, com cerca 30%. Segundo os autores, embora as três espécies estudadas apresentem alguma atividade, seja para extrato bruto ou partições, essas se mostram inativas para a atividade anticolinesterásica, de acordo com o critério estabelecido.

Outrossim, de acordo com Castro (2016), das 30 amostras de extratos vegetais de média e baixa polaridade analisadas quantitativamente, apenas 13,3% apresentaram fraca atividade inibitória da AChE, 43,3% apresentaram moderada atividade e 43,3%, apresentaram potente atividade, sempre levando-se em consideração a menor concentração estudada (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>). O autor destaca com melhores resultados *Citrus limonum*, *Ricinus communis* e *Senna occidentalis*, com porcentagem de inibição da atividade anticolinesterásica variando de 50% até 65%, na menor concentração. As espécies testadas apresentavam derivados de terpenoides e cumarinas. Dentre elas, da *C. limonum*, foi possível isolar a cumarina 2H-1-benzopiran-2-ona-5,7-dimetoxi, cuja atividade testada revelou uma inibição da AChE entre 92,3% e 100%.

É relevante destacar que, apesar dos métodos SPMM e SPSOX utilizarem o mesmo solvente (metanol), seus perfis de atividade foram diferentes, especialmente quanto à BuChE, o que pode ter sido evidenciado pelo impacto do método físico de extração. A extração por Soxhlet envolve aquecimento contínuo, o que pode levar à degradação de compostos termossensíveis, resultando em menor atividade (Sultana et al., 2009).

Esses resultados demonstram que os extratos de *Senega pulchella* apresentam maior seletividade para a inibição da AChE em relação à BuChE, com exceção do extrato SPULT, que mostrou melhor desempenho frente à BuChE. Tais achados reforçam a importância de se considerar a técnica de extração como fator determinante na atividade farmacológica dos extratos vegetais, em concordância com estudos prévios que indicam que tanto a polaridade do solvente quanto a intensidade do processo influenciam a extração de metabólitos bioativos (Gali; Bedjou, 2019; Keskin et al., 2025).

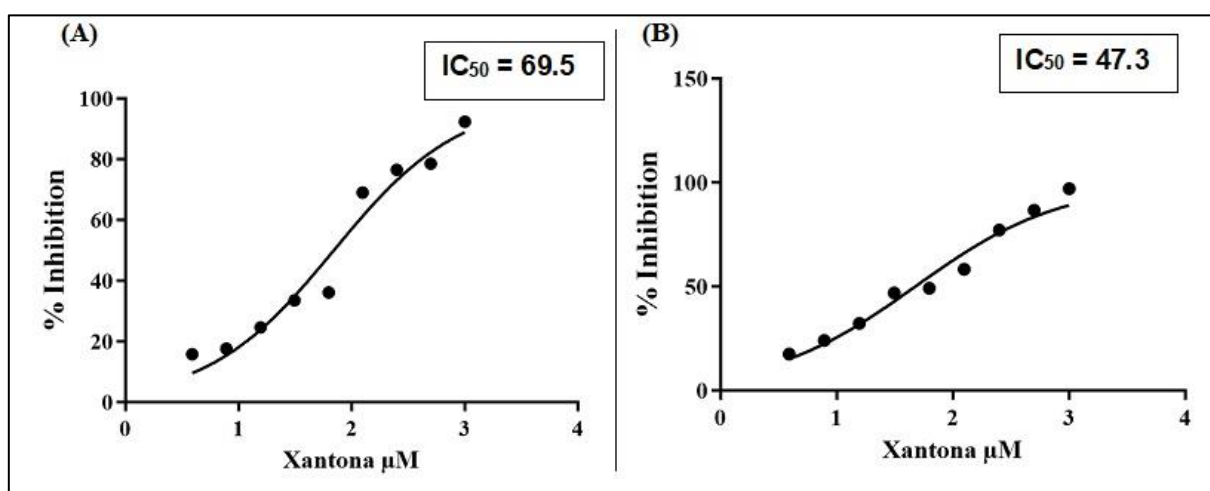
Em suma, os dados obtidos evidenciam o potencial dos extratos de *S. pulchella*, em especial o SPME, como fontes promissoras de inibidores de colinesterases, com possível aplicação em estudos voltados ao tratamento de doenças neurodegenerativas como o

Alzheimer. Ensaios futuros com fracionamento e identificação dos compostos ativos poderão esclarecer os mecanismos envolvidos e otimizar o uso terapêutico da espécie.

#### 4.6.4.2 Substâncias 2 e 3

As Substâncias 2 e 3 foram avaliadas quanto à atividade anticolinesterásica frente às enzimas AChE e BuChE, em uma faixa de concentrações de 7,81 a 1000  $\mu\text{M}$ , sendo posteriormente determinados os valores de  $\text{CI}_{50}$ .

A análise dos resultados obtidos nos ensaios *in vitro* evidencia que a Substância 2 apresenta atividade inibitória expressiva frente às duas colinesterases testadas, com efeito dependente da concentração. Em concentrações mais elevadas (1000  $\mu\text{M}$ ), o composto alcançou inibição de 92,4% da AChE e 97,1% da BuChE, demonstrando que é capaz de bloquear de forma significativa a atividade dessas enzimas. A curva dose–resposta ajustada revelou valores de  $\text{CI}_{50}$  de 69,5  $\mu\text{M}$  para AChE e 47,3  $\mu\text{M}$  para BuChE, sugerindo uma potência moderada e uma tendência de maior afinidade pela BuChE, como demonstra a Figura 42.



**Figura 42.** Curvas de concentração inibitória ( $\text{CI}_{50}$ ) da Substância 2 frente às enzimas colinesterases (AChE) e (BuChE)

Fonte: Elaboração própria

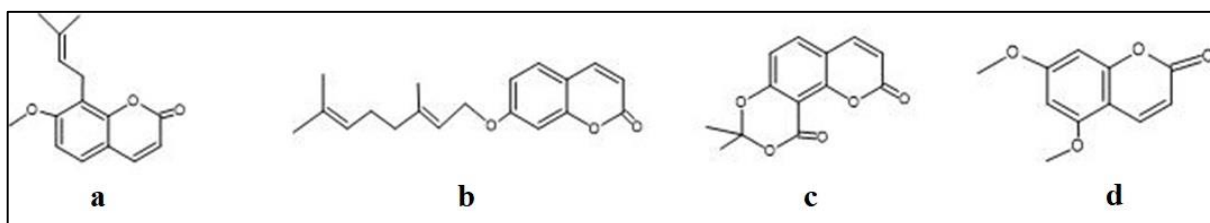
Esse perfil é particularmente relevante em relação ao contexto da Doença de Alzheimer, uma vez que estudos apontam que, à medida que a patologia progride, ocorre redução da atividade de AChE concomitante a uma manutenção ou aumento da atividade de BuChE (Nordberg et al., 2013). Assim, moléculas com maior sensibilidade à BuChE podem representar potenciais candidatos terapêuticos em estágios mais avançados da doença.

No estudo de Loh et al. (2021), uma nova série de derivados de xantona 3-O-substituídos foi avaliada quanto à inibição de acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE) e submetida ao *docking* molecular. Os resultados indicaram que esses derivados constituem estruturas-guia promissoras, passíveis de otimização para o desenvolvimento de inibidores potentes de AChE.

A atividade observada corrobora com dados da literatura que apontam o potencial de xantonas como inibidores de colinesterases, especialmente em virtude da sua estrutura planar e da capacidade de formar interações estáveis com o sítio ativo das enzimas (Yang A., et al., 2020; Cruz M.I., et al., 2017). A modificação química da xantona testada ou a associação com outros compostos bioativos pode ser uma estratégia viável para aumentar sua potência e seletividade (Mezeiova E., et al., 2018).

Dessa forma, os resultados obtidos reforçam o potencial dessa xantona como um protótipo para o desenvolvimento de novos inibidores de colinesterases, devendo ser considerados estudos adicionais de modelagem molecular, citotoxicidade e farmacocinética para avaliação do seu valor terapêutico.

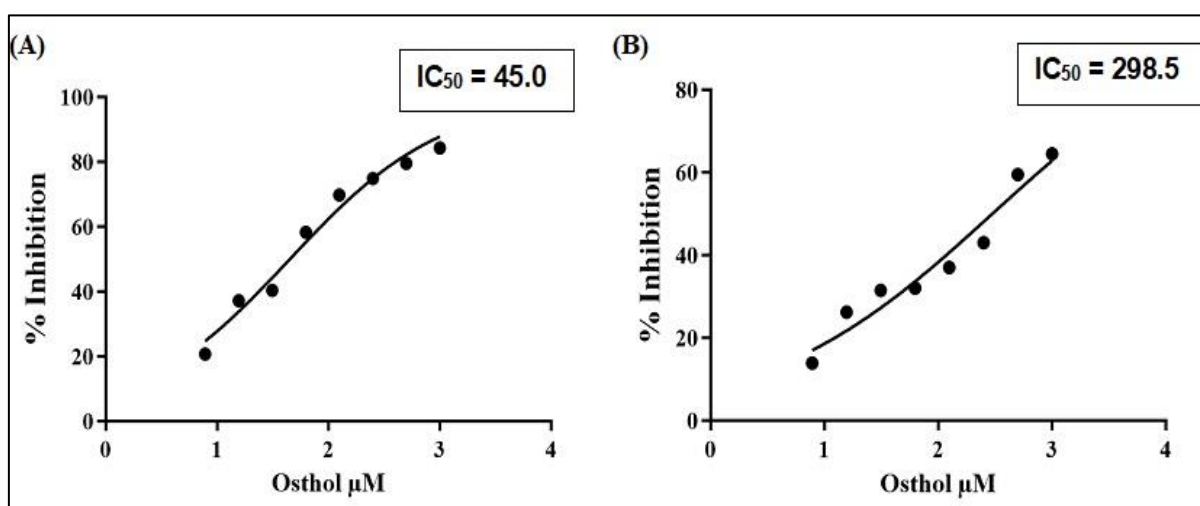
Os ensaios realizados com a Substância **3**, na concentração de 500  $\mu\text{M}$ , revelaram atividade inibitória expressiva frente às colinesterases, com 79,5% de inibição para AChE e 59,5% para BuChE. Esses valores são superiores aos observados para outras cumarinas, como aurapteno e poligaleno, que em estudo conduzido por Silva et al. (2015) apresentaram 29% e 52% de inibição, respectivamente, na mesma concentração. De modo semelhante, Castro (2016) relatou elevada atividade anticolinesterásica para a cumarina 2H-1-benzopiran-2-ona-5,7-dimetoxi, isolada de *Citrus limonum*, cuja inibição da AChE variou de 92,3% a 100%, confirmando o potencial desta classe de metabólitos como inibidores relevantes das colinesterases.



**Figura 43.** Estrutura química dos compostos mencionados: a – Osthol, b – Aurapteno, c – Poligaleno e d - 2H-1-benzopiran-2-ona-5,7-dimetoxi

Fonte: Elaboração própria

Os valores de  $IC_{50}$  obtidos indicam que a Substância **3** (Figura 44) atua como o inibidor mais eficaz da AChE em comparação à BuChE. A  $IC_{50}$  de 45  $\mu\text{M}$  para AChE evidencia um perfil de inibição seletivo e consistente, enquanto para BuChE a atividade foi consideravelmente menos expressiva ( $IC_{50} = 298,5 \mu\text{M}$ ). Quando comparado à outras cumarinas, a Substância **3** (Osthol) apresenta potência intermediária, mostrando-se mais ativo que o aurapteno e o poligaleno, mas inferior à cumarina isolada de *Citrus limonum*. Em conjunto, esses resultados reforçam o potencial do Osthol como candidato promissor para inibição da AChE, destacando-se frente a diversas cumarinas previamente descritas na literatura.



**Figura 44.** Curvas dose–resposta da Substância **3** frente às enzimas colinesterases. (A) Inibição da acetilcolinesterase (AChE). (B) Inibição da butirilcolinesterase (BuChE)

Fonte: Elaboração própria

O fato de o Osthol ser mais ativo frente à AChE é relevante do ponto de vista farmacológico, uma vez que os inibidores seletivos de AChE são os mais empregados no tratamento da doença de Alzheimer, por atuarem diretamente sobre a degradação da acetilcolina na fenda sináptica (Zhang et al., 2011). Por outro lado, BuChE também tem importância clínica em fases mais avançadas da doença, e compostos com inibição dual moderada são valorizados como candidatos a fármacos multifuncionais (Kandiah et al., 2017).

#### 4.6.5 Atividade Anticolinesterásica *in silico*

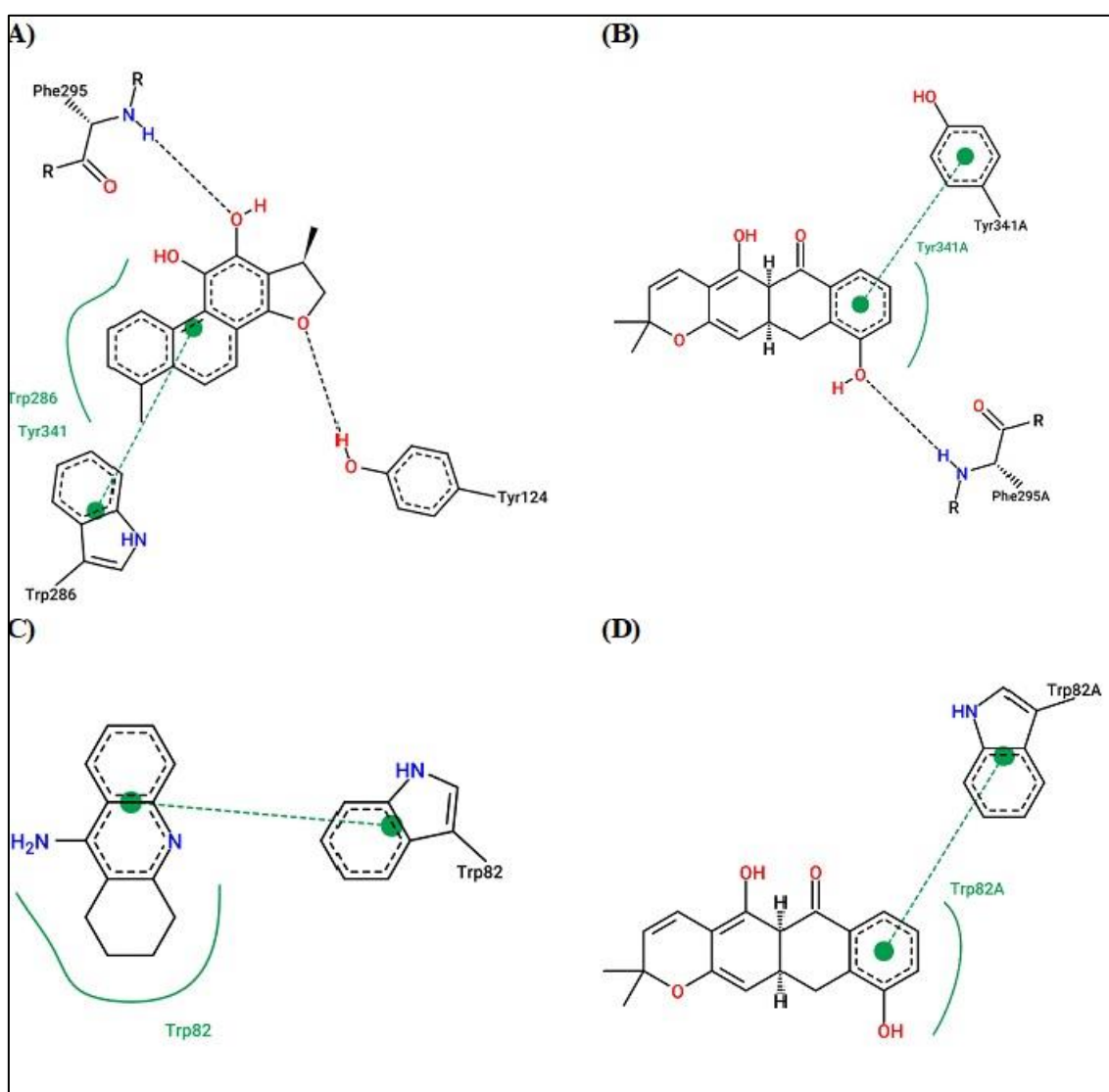
As Substâncias **2** e **3** foram submetidas a análises de acoplamento molecular frente às AChE e BuChE, visando prever os modos de ligação e estimar as energias de afinidade relativa. A partir dos complexos obtidos, foram identificadas as principais interações intermoleculares entre os ligantes e resíduos catalíticos dos sítios ortostéricos, possibilitando a comparação com inibidores de referência descritos na literatura.

Até o momento, não há relatos de estudos de acoplamento molecular frente às enzimas AChE e BuChE para a Substância **2** (1,5-di-hidroxi-6',6'-dimetilpirano[2',3':3,2]-xantona (6-desoxijacareubina)). O único estudo encontrado com esse núcleo pirano-xantônico avaliou o acoplamento molecular com elastase, evidenciando propriedades farmacocinéticas e de similaridade a fármacos (“*drug-likeness*”) favoráveis (Ambarwati et al., 2022; Teh et al., 2013). De modo semelhante, a Substância **3** (8-(3-metil-2-butenil)benzopiran-2-ona ou Osthol), uma prenilcumarina estruturalmente análoga à osthol e à osthenol, também não apresenta registros diretos de acoplamento molecular publicados. Contudo, análogos imediatos, como o osthol (7-metoxi-8-(3-metil-2-butenil)-2H-1-benzopiran-2-ona), já foram avaliados frente à AChE, demonstrando interações  $\pi$ - $\pi$  e hidrofóbicas com resíduos catalíticos e energias de ligação compatíveis com inibidores naturais (Yu et al., 2022). Outros estudos confirmam a capacidade de cumarinas preniladas de interagir com proteínas e enzimas humanas por mecanismos semelhantes (Bijari et al., 2013; Rossi et al., 2020). Assim, o presente trabalho representa o primeiro relato de modelagem molecular dessas duas substâncias frente às enzimas acetil- e butirilcolinesterase, ampliando o conhecimento sobre o potencial inibitório e o perfil de interação de metabólitos isolados de *Senega trichosperma*.

O acoplamento molecular da Substância **2** revelou uma afinidade de interação para ambas as enzimas, com energias de  $-10,2 \text{ kcal mol}^{-1}$  (AChE) e  $-9,4 \text{ kcal mol}^{-1}$  (BuChE), comparáveis às de ligantes cristalográficos de referência (Mande et al., 2025). Na AChE, o mapa bidimensional de interação (Figura 43 B) mostrou empilhamento  $\pi$ - $\pi$  com Tyr341, interações hidrofóbicas e ligação de hidrogênio com Phe295. Esses contatos aromáticos são semelhantes aos observados para a di-hidrotanshinona I (Figura 43 A), ligante natural estabilizado por interações  $\pi$ - $\pi$  e hidrogênio com Trp286, Tyr124 e Phe295 (Mendes et al., 2023). Embora os resíduos específicos possam diferir entre as enzimas, as interações ocorrem em regiões funcionalmente equivalentes ao longo do canal catalítico, o qual compreende os sítios periférico e catalítico, responsáveis pela estabilização do ligante e pelo bloqueio parcial do acesso ao sítio ativo (Türkeş et al., 2019).

Para a BuChE, o ligante cristalográfico tacrina (Figura 43 C), um dos primeiros fármacos aprovados para o tratamento de pacientes com Doença de Alzheimer, porém

descontinuado, estabelece empilhamento  $\pi$ - $\pi$  e interações hidrofóbicas com Trp82 (Mendes et al., 2023). Da mesma forma, o mapa de interação intermolecular da Substância 2 (Fig. 43D) evidenciou interação  $\pi$ - $\pi$  e contatos hidrofóbicos com Trp82, resíduo localizado no sítio aniônico da enzima e considerado determinante para o bloqueio do acesso do substrato ao sítio ortostérico (Kumar, Saha e Roy, 2020). Tal padrão de interação intermolecular repete-se em diferentes descrições para a tacrina, cujo anel aromático se ancora de forma estável a Trp82 (Teponnou, Joubert e Malan, 2017). Conforme apontado por Barbosa et al. (2023), o bloqueio desse resíduo é crucial para o efeito inibitório observado, o que pode justificar as elevadas porcentagens de inibição verificadas nos ensaios bioquímicos.

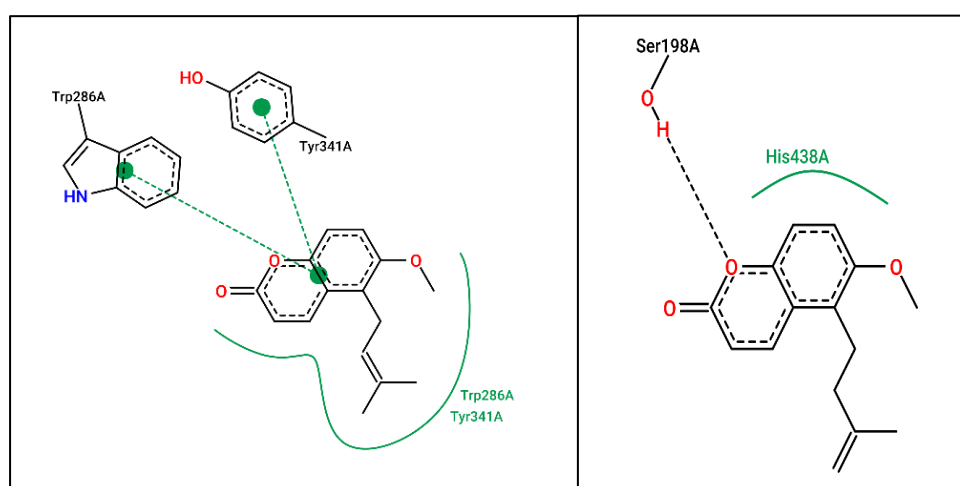


**Figura 45.** Mapas 2D das interações intermoleculares de ligantes cristalográficos (dihidrotanshinona I (A) para AChE e tacrina (C) para BuChE e a Substância 2 frente AChE (B) e BuChE (D)

Fonte: Elaboração própria

Na Substância **3** (Osthol) frente a AChE, observaram-se interações hidrofóbicas e de empilhamento  $\pi$ - $\pi$  com os resíduos aromáticos Trp286A e Tyr341A, localizados no sítio periférico aniônico, do inglês *peripheral anionic site* (PAS). Esses resultados são consistentes com estudos de derivados de osthole, que também interagem com tais resíduos por forças hidrofóbicas e de empilhamento aromático (Yu et al., 2022). Essas interações, de natureza predominantemente apolar e estabilizada por forças de dispersão, são típicas de sistemas aromáticos conjugados e contribuem para o ancoramento e estabilidade do complexo ligante-enzima.

Na BuChE, observaram-se ligações de hidrogênio com Ser198 e interações hidrofóbicas com His438, pertencentes à tríade catalítica, além de interações hidrofóbicas na cavidade aniônica. Esses parâmetros confirmam que o Osthol possui perfil de interação promissor frente ao sítio ativo de ambas as enzimas.



**Figura 46.** Representação do *docking* molecular da Substância **3** nos sítios de ligação da AChE (A) e BuChE (B)

Fonte: Elaboração própria

A simulação computacional da Substância **3** (osthol) revelou afinidade moderada pelas enzimas AChE ( $-7,6 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) e BuChE ( $-7,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). A proximidade entre esses valores sugere modos de interação comparáveis, indicando que o ligante apresenta potencial semelhante de estabilização frente a ambas as colinesterases. Experimentalmente, os ensaios *in vitro* confirmaram a maior eficácia inibitória do osthol sobre a AChE ( $CI_{50} = 45,0 \text{ } \mu\text{M}$ ), em relação à BuChE ( $CI_{50} = 298,5 \text{ } \mu\text{M}$ ) (Figura 42). Esse perfil de inibição seletiva é coerente com os resultados de acoplamento molecular, nos quais, mesmo com energias de ligação próximas, observaram-se interações mais estáveis e direcionadas ao sítio catalítico da AChE.

Comparado a outras cumarinas descritas na literatura, o osthol apresentou potência intermediária, sendo mais ativo que o aurapteno e o poligaleno, porém menos potente que a cumarina isolada de *Citrus limonum*. A convergência entre os dados *in silico* e *in vitro* reforça a plausibilidade do modelo de acoplamento proposto, demonstrando que as interações previstas estão em conformidade com o comportamento experimental observado.

Embora as simulações de acoplamento molecular não incorporem a dinâmica conformacional completa das macromoléculas, os resultados obtidos indicam que as substâncias analisadas exibem modos de ligação estruturalmente consistentes e afinidades compatíveis com inibidores de referência, sustentando o potencial farmacológico dos metabólitos isolados de *Senega trichosperma*.

No contexto das interações com as colinesterases, a Substância **2** apresentou capacidade de ancoragem em resíduos-chave associados à atividade catalítica, situados tanto no sítio periférico aniônico quanto no sítio catalítico, estabelecendo contatos hidrofóbicos, empilhamentos  $\pi$ - $\pi$  e ligações de hidrogênio. Esses achados indicam afinidade relevante pelas regiões de reconhecimento do substrato. De modo análogo, a Substância **3** também se ligou a resíduos essenciais à catálise, distribuídos ao longo dos sítios periféricos e aniônicos da enzima. Conjuntamente, esses parâmetros corroboram os resultados experimentais, confirmando que ambas as moléculas apresentam perfis de interação promissores frente aos sítios ativos de AChE e BuChE, em consonância com as energias relativas de afinidade e os valores de inibição determinados *in vitro*.

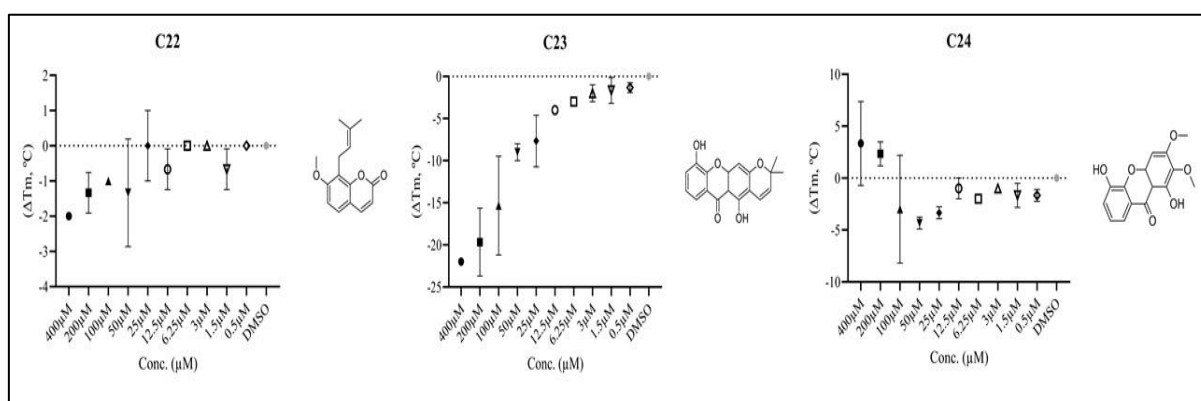
#### 4.6.6 Atividade Antileishmania

A fluorimetria de varredura diferencial, também conhecida como *Thermal Shift Assay* (TSA) ou *Differential Scanning Fluorimetry* (DSF), é uma técnica biofísica utilizada para avaliar a estabilidade térmica de proteínas e a interação entre proteínas e moléculas ligantes, como fármacos, peptídeos ou compostos naturais. O método baseia-se na detecção de alterações conformacionais da proteína por meio de um corante fluorescente sensível ao ambiente hidrofóbico. Trata-se de um processo de triagem de alto/médio rendimento que possibilita a seleção de moléculas potenciais devido ao efeito (des)estabilizador de centenas de compostos na estrutura terciária da proteína e, conseqüentemente, sua habilidade de se ligar ao alvo e provocar uma resposta biológica (Neri et al., 2020).

Nesse contexto, as Substâncias **2**, **3** e **4** foram avaliadas quanto à sua capacidade de interação com a enzima superóxido dismutase B2 (LbSODB2) de *Leishmania braziliensis* por

meio dessa metodologia. A variação no ponto de fusão ( $\Delta T_m$ ) obtida para cada composto indicou o grau de estabilização da proteína, permitindo inferir o potencial de ligação das moléculas ao sítio ativo da LbSODB2.

Dentre os compostos avaliados, apenas a Substância **2** apresentou uma curva de concentração-resposta completamente linear, com pico de variação de derretimento da proteína ( $\Delta T_m$ ) correspondendo a  $-22^\circ\text{C}$  (Figura 47). De forma similar, porém não linear, a Substância **3** (Figura 47) apresentou tendências de aumento do deslocamento de  $\Delta T_m$  compatível ao aumento da sua concentração. Ambos os compostos apresentam valores de deslocamento negativo e, embora deslocamentos positivos geralmente estejam associados à estabilização da proteína por ligação ao estado nativo, deslocamentos negativos também são relevantes, pois podem sugerir mecanismos alternativos de interação ou potencial alosteria inversa. A Substância **4**, por sua vez, apresentou deslocamento térmico positivo em altas doses, porém a falta de linearidade nos resultados não revela o composto como um inibidor eficaz (Figura 47).



**Figura 47.** Gráfico do ensaio concentração-resposta das Substâncias 2, 3 e 4 frente a LbSODB2

Fonte: Elaboração própria

Os deslocamentos negativos observados nas Substâncias **2** e **3** indicam uma possível desestabilização da estrutura da proteína através de diversos motivos: a abertura parcial da estrutura terciária, a exposição de regiões hidrofóbicas ou até mesmo a ligação a estados parcialmente desnaturados da proteína (Cimpmperman et al., 2008). Por conta da sua linearidade e reprodutibilidade, estudos complementares podem elucidar as características fundamentais para o perfil de interação observado para a Substância **2**.

## 5 CONCLUSÃO

O presente trabalho contribuiu de forma significativa para o conhecimento fitoquímico e biológico de duas espécies do gênero *Senega* (Polygalaceae): *S. pulchella* e *S. trichosperma*. Foi realizado um estudo detalhado dos extratos brutos e frações dessas espécies, permitindo a caracterização de metabólitos secundários com reconhecida relevância farmacológica.

As frações particionadas foram submetidas a sucessivos processos cromatográficos, que possibilitaram o isolamento e a identificação de quatro substâncias puras: Substância **1** (2,2-dimetilpiranocumarina), Substância **2** (1,5-di-hidroxi-6',6'-dimetilpirano[2',3':3,2]-xantona), e Substância **3** (8-(3-metil-2-butenil)benzopiran-2-ona) isoladas de *S. trichosperma*; e Substância **4** (1,5-di-hidroxi-2,3-dimetoxixantona), isolada de *S. pulchella*. Trata-se do primeiro registro dessas substâncias nestas espécies, ampliando o inventário químico do gênero *Senega* no Brasil.

Para *S. pulchella*, avaliou-se o efeito de diferentes métodos de extração — Maceração Metanólica (MM), Maceração Etanólica (ME), Soxhlet (SOX) e Ultrassom (ULT) — sobre o rendimento, composição química e bioatividade dos extratos. As análises por CLAE-DAD revelaram perfis cromatográficos semelhantes entre os métodos, destacando-se a presença consistente de dois marcadores químicos, o ácido salicílico e a Substância **4**, em todas as amostras analisadas.

De modo geral, os extratos e partições de *S. trichosperma* e *S. pulchella* apresentaram resultados expressivos nas avaliações antioxidantes e nos ensaios de letalidade frente à *Artemia salina*, evidenciando o potencial dessas espécies como fontes de compostos com propriedades redox e bioatividade moderada. Além disso, os extratos brutos de *S. pulchella* obtidos por diferentes métodos de extração revelaram atividades significativas nos ensaios antioxidante, antimicrobiano, citotóxico e anticolinesterásico, confirmando a influência do método e do solvente extrator sobre o perfil químico e biológico das amostras. Esses resultados reforçam a versatilidade metabólica das espécies estudadas e a relevância do gênero *Senega* na prospecção de substâncias bioativas com potencial farmacológico.

As Substâncias **2** e **3** apresentaram atividade anticolinesterásica, evidenciando potencial efeito neuroprotetor. Essas mesmas substâncias também demonstraram capacidade de interação com a enzima LbSODB2 de *Leishmania braziliensis*, que revelou alterações conformacionais indicativas de possível ligação ao sítio ativo da proteína, que sugerem que as Substâncias **2** e **3** podem atuar como moduladores não convencionais da LbSODB2, interferindo em processos oxidativos parasitários. Além disso, nos ensaios antimicrobianos, as Substâncias **2** e **3** exibiram

efeito inibitório moderado, reforçando a importância de compostos prenilados e lipofílicos na expressão da atividade antimicrobiana observada.

Em suma, os resultados deste trabalho corroboram o potencial farmacológico das espécies *Senega pulchella* e *S. trichosperma* como fontes promissoras de compostos antioxidantes, antimicrobianos, citotóxicos e anticolinesterásicos. Além disso, contribuem para a quimiotaxonomia do gênero *Senega* e para o desenvolvimento de futuras pesquisas voltadas à prospecção de moléculas bioativas de origem vegetal.

## REFERÊNCIAS

- ABDALLA, M. A. et al. Insights into natural products with cholinesterase inhibitory activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 163, p. 104–129, 2019
- ABDOLMALEKI, A.; GHASEMI, J.; GHASEMI, F. Computer aided drug design for multi-target drug design: SAR/QSAR, molecular docking and pharmacophore methods. *Current Drug Targets*, v. 18, n. 5, p. 556–575, 2017. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389450117666160101120822>.
- ABREU, S. M.; BRANCO, S. S. Natural product-like combinatorial libraries. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 14, n. 5, p. 675–712, 2003.
- ANVISA. Anuário Estatístico do Mercado Farmacêutico – 2022. Brasília, DF: CMED/ANVISA, 2023. Disponível em: <gov.br/anvisa/.../anuario-estatistico-2022/view>. Acesso em: 05 mar. 2025.
- ALARCON R. et al. P. Bibliometric analysis of medicinal plants' original articles from Latin America and the Caribbean Region. [*S. l.: s. n.*], 2023.
- ALVES, C. Q. et al. Methods for determination of *in vitro* antioxidant activity for extracts and organic compounds. *Química Nova*, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- AMORATI, R.; VALGIMIGLI, L. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. *Free Radical Research*, v. 49, n. 5, p. 633–649, 2015.
- ANYWAR G, et al. A Review of the Toxicity and Phytochemistry of Medicinal Plant Species Used by Herbalists in Treating People Living With HIV/AIDS in Uganda. *Front Pharmacol*. 2021. doi: 10.3389/fphar.2021.615147. PMID: 33935707; PMCID: PMC8082237.
- ARAÚJO, Joana et al. Chiral derivatives of xanthenes with antimicrobial activity. *Molecules*, v. 24, n. 2, p. 314, 2019.
- AZWANIDA, N. N. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med aromat plants*, v. 4, n. 196, p. 2167-0412, 2015.
- BARBOSA FILHO, J. M. et al. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 16, n. 2, p. 258–285, 2006.
- BARILLARI, J. et al. Kaiware Daikon (*Raphanus sativus* L.) extract: a naturally multipotent chemopreventive agent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, n. 17, p. 7823–7830, 2008.
- BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, v. 219, n. 6, p. 561–571, 2004.
- BENN, A. C. *Constituintes químicos da espécie vegetal*. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2020.

BERTOLDI, M. C. Atividade antioxidante *in vitro* da fração fenólica, dos óleos resinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi). 2006. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

BFG. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, v. 66, p. 1085–1113, 2015.

BORGES, F. R. M. et al. Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract, dichloromethane fraction and steroid  $\alpha$ -spinasterol from *Senega sabulosa* in LPS-induced peritonitis in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 151, n. 1, p. 144–150, 2014.

BORGES, F. R. M. et al. Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract, dichloromethane fraction and steroid  $\alpha$ -spinasterol from *Senega sabulosa* in LPS-induced peritonitis in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 151, n. 1, p. 144–150, 2014a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, DF: ANVISA, 2003. Disponível em: <portal da Biblioteca Virtual em Saúde>. Acesso em: 10 set. 2024. (Obs.: a RE 899 foi posteriormente revogada pela RDC 166/2017; mantenho aqui por coerência histórica, mas, se preferir, cito também o Guia n.º 10/2022 para tratamento estatístico.)

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 31 mar. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. *A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos*. Brasília, 2006. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia\\_no\\_sus.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf). Acesso em: 29 abr. 2022.

BREIJYEH, Z.; KARAMAN, R. Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment. *Molecules*, v. 25, n. 24, p. 5789, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25245789>

BRIGHENTE, I. M. C.; DIAS, M.; VERDI, L. G.; PIZZOLATTI, M. G. Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharmaceutical biology*, v. 45, n. 2, p. 156-161, 2007.

BRITO, C. C. B. et al. Molecular cloning and biochemical characterization of iron superoxide dismutase from *Leishmania braziliensis*. *Molecular Biotechnology*, v. 60, n. 8, p. 595-600, ago. 2018.

BURKHARDT, G. et al. Biphenyls and xanthenes from the Podostemaceae. *Phytochemistry*, v. 31, n. 2, p. 543–548, 1992.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin América: a personal view. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p. 131–134, 2005.

CAPRA, J. C. et al. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Senega sabulosa* (Polygalaceae) in mice: evidence for the involvement of monoaminergic systems. *European Journal of Pharmacology*, v. 643, n. 2–3, p. 232–238, 2010.

CARVALHO, A. C. B. et al. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. *T&C Amazônia*, ano V, n. 11, jun. 2007.

CASTRO, S.; KLUGE, R.; PERES, L. *Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática*. Piracicaba: Livroceres, 2005. 650 p.

CASTRO, V. T. N. de A. Atividade anticolinesterásica de plantas da Caatinga com indicação popular para distúrbios do sistema nervoso. 2016. Tese (Doutorado).

CAVAZZUTI, A. et al. Discovery of potent pteridine reductase inhibitors to guide antiparasite drug development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 5, p. 1448-1453, 2008.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, v. 21, n. 1, p. 99–105, 1998.

CHAVES, M. H. et al. Total phenolics, antioxidant activity and chemical constituents from extracts of *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 1, p. 106–112, 2010.

CHEMAT, F. et al. Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 41, p. 357-377, 2017.

CHEN, Z.; BERTIN, R.; FROLDI, G. EC<sub>50</sub> estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry*, v. 138, n. 1, p. 414–420, 2013.

CHEUNG, J.; GARY, E. N.; SHIOMI, K.; ROSENBERRY, T. L. Structures of human acetylcholinesterase bound to dihydrotanshinone I and territrem B show peripheral site flexibility. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, v. 4, n. 11, p. 1091–1096, 2013.

CHOI, H. L. et al. The global procurement landscape of leishmaniasis medicines. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 15, n. 2, p. e0009181, 18 fev. 2021.

CHUNG, Y. S. et al. Screening of plant extracts for acetylcholinesterase inhibitory activity and neuroprotective effects. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 222, p. 274–282, 2018.

CIMPERMAN, P. et al. A quantitative model of thermal stabilization and destabilization of proteins by ligands. *Biophysical Journal*, v. 95, n. 7, p. 3222-3231, out. 2008.

CIMPERMAN, P.; MATULIS, D. Medidas de desnaturação térmica de proteínas por meio de um corante fluorescente. In: *Sociedade Real de Química. Medidas de desnaturação térmica de proteínas*. [S. l.: s. n.], 2011.

CLARKE, D. G.; CROMBIE, L.; WHITING, D. A. Conversion of phenols into chromens: regioselectivity and scope. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, n. 0, p. 1007-1015, 1974. DOI: 10.1039/P19740001007.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “in vitro” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.

COELHO-FERREIRA, M. R. Morphology, ontogeny and structure of the stipular nectaries in *Caamembeca spectabilis* (Polygalaceae). *Acta Amazonica*, v. 46, n. 2, p. 127–132, 2016.

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*, v. 58, n. 7-8, p. 490-494, 2003.

CRUZ, M.; CIDADE, H.; PINTO, M. Dual/multitargeted xanthone derivatives for Alzheimer's disease: where do we stand? *Future Med Chem.* 2017 Sep;9(14):1611-1630. doi: 10.4155/fmc-2017-0086. Epub 2017 Aug 23. PMID: 28832188.

D'ALEO, V. et al. The non-peptidyl low molecular weight radical scavenger IAC protects human pancreatic islets from lipotoxicity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 309, n. 1–2, p. 63–66, 2009.

DAO, T. T. et al. Xanthenes from *Senega karensium* inhibit neuraminidases from influenza A viruses. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 22, n. 11, p. 3688–3692, 2012.

DE ALMEIDA, R. B. M. et al. Identification of a novel dual inhibitor of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase: *in vitro* and *in silico* studies. *Pharmaceuticals*, v. 16, n. 1, p. 95, 2023.

DE OLIVEIRA, L. S. S. et al. Two new labdane-type diterpenoids and others compounds from *Conchocarpus cyrtanthus* (Rutaceae). *Revista Virtual de Química*, v. 8, p. 87–96, 2016.

DEMESA, A. G. et al. Overview and toxicity assessment of ultrasound-assisted extraction of natural ingredients from plants. *Foods*, v. 13, n. 19, p. 3066, 2024.

DEWICK, S. M. *Medicinal natural products*. Chichester: John Wiley & Sons, 2009.

DOS SANTOS, M. H.; BATISTA, B. L. Influence of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee (*Coffea arabica*). *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 604–610, 2007.

DUARTE, F. S. et al. Psychopharmacological effects and safety of styryl-2-pyrones and dihydrostyryl-2-pyrones-rich fraction from *Senega sabulosa*: absence of withdrawal syndrome and tolerance to anxiolytic-like and anticonvulsant effects. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 70, n. 9, p. 1272–1286, 2018.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, v. 112, p. 4–29, 2016.

EFE, C.; LYKAKIS, I. N.; STRATAKIS, M. Gold nanoparticles supported on TiO<sub>2</sub> catalyse the cycloisomerisation/oxidative dimerisation of aryl propargyl ethers. *Chemical Communications*, v. 47, n. 2, p. 803–805, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1039/C0CC03954D>.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).

FARINA, M. et al. Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 57, n. 11, p. 1503-1508, 2005.

FILGUEIRA, J. P. P. S.; KIKUCHI, T. Y. S.; COELHO-FERREIRA, M. R. Morphology, ontogeny and structure of the stipular nectaries in *Caamembeca spectabilis* (Polygalaceae). *Acta Amazonica*, v. 46, n. 2, p. 127–132, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1809-4392201500121>.

FILHO, V. C. Estratégias para obtenção de produtos naturais bioativos. 1997. Apud BYRNE, L. T.; COLEGATE, S. M. *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structure Determination*. Flavonoides e seu potencial terapêutico. [S.l.: s.n.], [s.d.].

FLOEGEL, A. et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 24, n. 7, p. 1043–1048, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>.

FLORA DO BRASIL 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 22 mar. 2024.

FORZZA, R. C. et al. New Brazilian Floristic List Highlights Conservation Challenges. *BioScience*, v. 62, n. 1, p. 39–45, 2012. DOI: 10.1525/bio.2012.62.1.8

GETACHEW, F.; GEDAMU, L. *Leishmania donovani* mitochondrial iron superoxide dismutase A is released into the cytosol during miltefosine induced programmed cell death. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 183, n. 1, p. 42-51, 1 maio 2012.

GONÇALVES, G. A. et al. Natural and synthetic coumarins as antileishmanial agents: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 203, p. 112514, 2020.

GRONDONA, E. M. Las especies argentinas del género *Senega*. *Darviniana*, v. 8, n. 2–3, p. 279–405, 1948.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Drug design, biotechnology and medicinal chemistry: applications to infectious diseases. *Estudos Avançados*, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-40142010000300007>.

HAMIDI, M. R.; JOVANOVA, B.; PANOVSKA, T. K. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, v. 60, n. 1, p. 9–18, 2014. DOI: <https://doi.org/10.33320/maced.pharm.bull.2014.60.01.002>.

HARBORNE, J. B. Phenolic compounds. In: *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1984. p. 37-99.

HOSHINO, T; MATSUZAWA, S; TAKAHASHI R. 6-Deoxyjacareubin, a natural compound preventing hypoxia-induced cell death, ameliorates neurodegeneration in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Res*. 2021 Feb; 163:43-51. doi: 10.1016/j.neures.2020.02.011. Epub 2020 Mar 4. PMID: 32145212.

HUBBARD, R. E.; HAIDER, M. K. Hydrogen Bonds in Proteins: Role and Strength. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0003018.pub2>.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos: DOQ-CGCRE-008. 2024. INPE. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Câmeras Imageadoras CBERS 04A. Disponível em: <http://www.inpe.br>. Acesso em: 15 fev. 2022.

INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. *Flora e Funga do Brasil*. Rio de Janeiro: JBRJ, 2025. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 24 jul. 2025.

JING, Yiyao et al. Unveiling the phytochemical profile and antioxidant activity of roots from six *Polygala* species. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 17, n. 9, p. 105915, 2024.

JUNIOR, A. C. Constituintes químicos da espécie vegetal *Polygala sabulosa* AW Bennett (Polygalaceae). 2002. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

KANDIAH, N. et al. Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson's disease dementia. *Clinical Interventions in Aging*, v. 12, p. 697-707, 18 abr. 2017. DOI: 10.2147/CIA.S129145.

KRÓLICKA, A. et al. Induction of secondary metabolite production in transformed callus of *Ammi majus* L. grown after electromagnetic treatment of the culture medium. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 7, p. 1386-1391, 2006.

KUMAR, V.; SAHA, A.; ROY, K. In silico modeling for dual inhibition of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) enzymes in Alzheimer's disease. *Computational Biology and Chemistry*, v. 88, p. 107355, 2020.

KUSKOSKI, E. et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, v. 25, p. 726-732, 2005.

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, p. 112417, 2020.

LANE, R. M.; POTKIN, S. G.; ENZ, A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 9, n. 1, p. 101-124, 2006.

LAPA, F. R. Avaliação da atividade antinociceptiva, anti-inflamatória e protetora gástrica do extrato hidroalcoólico bruto de *Senega paniculata*. 2006. **120 f.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LEE, Ji-Eun et al. The influence of solvent choice on the extraction of bioactive compounds from Asteraceae: A comparative review. *Foods*, v. 13, n. 19, p. 3151, 2024.

LEITE, W. P.; AGUIAR-DIAS, A. C.; FIERRO-FREIRE, A. M. Pollen diversity inrazilian species of *Monnina* (Polygalaceae). *Phytotaxa*, v. 220, p. 117-126, 2015.

LI, J.; FU, A.; ZHANG, L. An overview of scoring functions used for protein–ligand interactions in molecular docking. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, v. 11, n. 2, p. 320-328, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12539-019-00327-w>. Acesso em: 24 ago. 2025.

LI, X. et al. Memory-enhancing effects of the crude extract of *Senega tenuifolia* on aged mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2014, p. 1-10, 2014.

- LING, Y. et al. Analysis and detection of the chemical constituents of *Radix Senegae* and their metabolites in rats after oral administration by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 85, p. 1-13, 2013.
- Liu X, Shen J, Zhu K. Antibacterial activities of plant-derived xanthenes. *RSC Med Chem*. 2021 Dec 21;13(2):107-116. doi: 10.1039/d1md00351h. PMID: 35308024; PMCID: PMC8864485.
- LIU, D. et al. HPLC fingerprint analysis and content determination of extract with anticancer activities of *Sedi linearis Herba*. *Pharmacognosy Journal*, v. 9, n. 6, p. 128-134, 2017.
- LIU, J. et al. Determination of the active ingredients and biopotency in *Senega tenuifolia* Willd. and the ecological factors that influence them. *Infection, Genetics and Evolution*, 2019.
- LIU, Z. et al. Application of molecular docking for the degradation of organic pollutants in the environmental remediation: A review, *Chemosphere*, v. 203, p. 139-150, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.179>
- LOH Z.H. et al. New 3-*O*-substituted xanthone derivatives as promising acetylcholinesterase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2021 Dec;36(1):627-639. doi: 10.1080/14756366.2021.1882452. PMID: 33557647; PMCID: PMC8759733.
- LOPES, K. H. S. Análise de metabólitos secundários de nove espécies do gênero *Senega* utilizando multiplataformas analíticas. 2022. 116 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais do Brasil*. São Paulo: [s.n.], 2002. 386 p.
- LUDTKE, R.; MIOTTO, S. T. S. A família Polygalaceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 6, p. 245-251, 2008.
- LÜDTKE, R.; SOUZA-CHIES, T. T.; MIOTTO, S. T. S. O gênero *Senega* L. (Polygalaceae) na região Sul do Brasil. *Hoehnea*, v. 40, n. 1, p. 1-50, 2013.
- LUQUE, F.; MUÑOZ-TORRERO, D. Acetylcholinesterase: a versatile template to coin potent modulators of multiple therapeutic targets. *Accounts of Chemical Research*, v. 57, n. 4, p. 450-467, 2024.
- MAGINA, M. A. et al. Antioxidant activity of three species of *Eugenia* (Myrtaceae). *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 29, n. 3, p. 376-382, 2010.
- MANDE, S. et al. Computational design and molecular insights into acetylcholinesterase inhibitors from *Aristolochia indica* for Alzheimer's disease therapy. *Discover Chemistry*, v. 2, n. 1, p. 126, 2025. <https://doi.org/10.1007/s44371-025-00197-w>
- MARQUES, M. C. M.; GOMES, K. Polygalaceae. In: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M.; MELHEM, T. S.; BITTRICH, V.; KAMEYAMA, C. (eds.). *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. São Paulo: Instituto de Botânica, 2002. v. 2. p. 229-260.
- MARQUES, M. C. M.; PEIXOTO, A. L. P. Estudo taxonômico de *Senega* subgênero *Ligustrina* (Chodat) Paiva (Polygalaceae). *Rodriguésia*, v. 58, p. 95-146, 2007.

MARTINS, R. D. S. et al. Synergistic neurotoxicity induced by methylmercury and quercetin in mice. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, p. 645-649, 2009.

MARTINS, R. et al. Green Extraction Techniques of Bioactive Compounds: A State-of-the-Art Review. *Processes*, v. 11, n. 8, e2255, 2023. DOI: 10.3390/pr11082255.

MASCARENHAS, A. M. S. et al. Pharmacophore-based virtual screening and molecular docking to identify promising dual inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2020.

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

MENDES, G. et al. Molecular Multi-Target Approach for Human Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase and  $\beta$ -Secretase 1: Next Generation for Alzheimer's Disease Treatment. *Pharmaceuticals*. 2023; 16(6):880. <https://doi.org/10.3390/ph16060880>

MERINO, F. J. Z. et al. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *Artemia salina*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 17, n. 4, supl. 3, p. 1031-1040, 2015.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.

MEZEIOVA E. et al. Profiling donepezil template into multipotent hybrids with antioxidant properties. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2018 Dec;33(1):583-606. doi: 10.1080/14756366.2018.1443326. PMID: 29529892; PMCID: PMC6009928.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). Biodiversidade Brasileira: Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília: MMA/SBF, 2002. 404 p.

MISSAU, F. C. Estudo das propriedades químicas, estruturais e biológicas das espécies *Senega paniculata* e *Senega pulchella*. 2008. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MIYASE, T.; NOGUCHI, H.; CHEN, X.-M. Sucrose esters and xanthone C-glycosides from the roots of *Senega sibirica*. *Journal of Natural Products*, v. 62, n. 7, p. 993-996, 1999.

MONTANHER, A. B. S.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Monitoramento dos extratos brutos de espécies de *Senega* (Polygalaceae) utilizando *Artemia salina*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 13, p. 66-68, 2003.

MUKANDIWA, L. et al. Isolation of seselin from *Clausena anisata* (Rutaceae) leaves and its effects on the feeding and development of *Lucilia cuprina* larvae may explain its use in ethnoveterinary medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 150, n. 3, p. 886-891, 2013.

MUKHERJEE, S. K.; KUMAR, V.; MAL, M.; HOUGHTON, S. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, v. 14, p. 289-300, 2007.

NARE, B.; HARD, L. W.; BEVERLEY, S. M. The roles of pteridine reductase 1 and synthase in pteridine metabolism in the protozoan parasite *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.*, v. 272, p. 13883-13891, 1997.

NASCIMENTO, P. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NEGRESCU, V. et al. QSAR study on antioxidant activity and lipophilicity of some natural xanthenes. *Revue Roumaine de Chimie*, v. 61, n. 12, p. 925–930, 2016.

NERI, F. S. M. et al. Antileishmanial activity evaluation of thiazolidine-2, 4-dione against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*. *Parasitology Research*, v. 119, n. 7, p. 2263-2274, 2020.

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of natural products*, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NIESEN, F. H.; BERGLUND, H.; EDADI, M. V. O uso da fluorimetria de varredura diferencial para detectar interações de ligantes que promovem a estabilidade de proteínas. *Nature Protocols*, v. 2, n. 9, p. 2212–2221, 2007.

NIU S.L. et al. Xanthenes from the stem bark of *Garcinia bracteata* with growth inhibitory effects against HL-60 cells. *Phytochemistry*. 2012 May; 77:280-6. doi: 10.1016/j.phytochem.2012.01.010. Epub 2012 Feb 9. PMID: 22325589.

NOGUEIRA, F. L. S. et al. Atividade analgésica e antiedematogênica de *Senega paniculata* L. (Polygalaceae) selvagem e obtida por micropropagação. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, p. 310-315, 2005.

NORDBERG A. et al. A review of butyrylcholinesterase as a therapeutic target in the treatment of Alzheimer's disease. *Prim Care Companion CNS Disord.* 2013;15(2):PCC.12r01412. doi: 10.4088/PCC.12r01412.

OLIVIERI, A. C. Practical guidelines for reporting results in single-and multi-component analytical calibration: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, v. 868, p. 10-22, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Leishmaniose. 2025. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 16 maio 2025.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). *Situación regulamentaria de los medicamentos: una reseña mundial*. Washington: Organización Panamericana de la Salud (OPAS), 2000.

OSMAN, M. S. et al. In vitro evaluation, in silico studies and toxicological assay of some xanthenes as potential *Leishmania donovani* inhibitors. *Informatics in Medicine Unlocked*, v. 30, p. 100954, 2022.

OSTROWSKA, K. et al. Synthesis of a new series of aryl/heteroarylpiperazinyl derivatives of 8-acetyl-7-hydroxy-4-methylcoumarin with low nanomolar 5-HT<sub>1A</sub> affinities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 137, p. 108-116, 2017.

PAIVA, J. A. R. *Senegarum Africanarum et Madagascariensium prodmos atque gerontogaei generis Heterosamara Kuntze, a genere Senega segregati et a nobis denuo recepti, synopsis monographica. Fontqueria*, v. 50, n. 1-4, p. 1-347, 1998.

PASTORE, J. F. B. A new species and new combination in *Polygala* sect. *Timutua* series *Timoutoideae* from Brazil. *Kew Bulletin*, v. 73, n. 4, p. 51, 2019. DOI: 10.1007/s12225-018-9773-2.

PASTORE, J. F. B. *Polygala minarum* (Polygalaceae), a new species endemic to southern Minas Gerais, Brazil. *Kew Bulletin*, v. 71, n. 3, p. 42, 2016. DOI: 10.1007/s12225-016-9658-1.

PASTORE, J. F. B. *Senega veadeiroensis* (Polygalaceae), a new species of *Senega* endemic to Chapada dos Veadeiros, Goiás, Brazil. *Kew Bulletin*, v. 73, p. 37, 2018.

PASTORE, J. F.; MARTINEZ, A.; ABBOTT, J. R.; NEUBIG, K. Rumo a novas delimitações genéricas em Polygalaceae II: *Senega*. *Anais do Jardim Botânico do Missouri*, v. 108, n. 1, p. 126-249, jun. 2023.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. et al. Otimização de metodologia analítica para o doseamento de flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. *Química Nova*, v. 33, n. 2, p. 288-291, 2010.

PENA, H. P. et al. Accuracy of diagnostic tests for American tegumentary leishmaniasis: a systematic literature review with meta-analyses. *Tropical Medicine & International Health*, v. 25, n. 10, p. 1168–1181, out. 2020.

PEREIRA, M. Estudo fitoquímico e biológico de *Senega linooides*. 2017. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PIZZOLATTI, M. G. et al. A new styryl-2-pyrone derivative from *Senega sabulosa* (Polygalaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 32, p. 603-606, 2004.

PRADO, J. M.; ROSTAGNO, M. A. (Ed.). Natural product extraction: principles and applications. Royal Society of Chemistry, 2022.

PUPPO, M. T.; GALLO, M. B. C. Biologia química: uma estratégia moderna para pesquisa em produtos naturais. *Química Nova*, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

RAJABI, M.; AMIRI, S.; REZAZADEH-BARI, M. Optimization of hesperidin extraction using hot methanol method assisted with ultrasound waves from the peel wastes of bitter orange (*Citrus aurantium*) and Persian orange (*Citrus reticulata*). *Journal of Food Measurement and Characterization*, v. 17, n. 6, p. 5582-5593, 2023.

ROCHA L. et al. An antifungal gamma-pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*. 1994 Aug;36(6):1381-5. doi: 10.1016/s0031-9422(00)89727-7. PMID: 7765428.

ROCHA, J. et al. Evaluation of biological activity of *Polygala boliviensis* in experimental models. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, v. 18, n. 2, p. 793, 2019.

ROCHA, J. L. C. Caracterização química e atividades biológicas *in vitro* e *in silico* de *Asemeia ovata* (Polygalaceae). 2016. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA.

ROCHA, J. L. C. Determinação quantitativa por CLAE-DAD de salicilato de metila e atividade antinociceptiva em espécies do gênero *Senega* (Polygalaceae) ocorrentes no semiárido e cultivadas. 2012. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA.

ROSENBERRY, T. L. et al. Hopeahainol A binds reversibly at the acetylcholinesterase (AChE) peripheral site and inhibits enzyme activity with a novel higher order concentration dependence. *Chemico-Biological Interactions*, v. 259, p. 78-84, 2016.

RUKACHAISIRIKUL, V. et al. Xanthones from the stem bark of *Garcinia nigrolineata*. *Phytochemistry*, v. 64, n. 6, p. 1149-1156, 2003.

SAJADI, S. E.; ZEYNIVAND, H.; SHOKOUHINIA, Y. Isolation and identification of osthol from the fruits and essential oil composition of the leaves of *Prangos asperula* Boiss. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, v. 12, n. 6, p. 681-686, 2009.

SAMPAIO, D. O. Avaliação do perfil fitoquímico e da atividade biológica *in vitro* das flores da espécie *Pityrocarpa moniliformis* (Benth.) Luckow & R. W. 2024. 77 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Exatas) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2024.

SANTI, A. M. M.; MURTA, S. M. F. Antioxidant defence system as a rational target for Chagas disease and Leishmaniasis chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 117, p. e210401, 2022.

SANTOS T.C. et al. Naturally Occurring Acetylcholinesterase Inhibitors and Their Potential Use for Alzheimer's Disease Therapy. *Front Pharmacol*. 2018 Oct 18;9:1192. doi: 10.3389/fphar.2018.01192. PMID: 30405413; PMCID: PMC6201143.

SHAHIDI, F.; HOSSAIN, A. Importance of insoluble-bound phenolics to the antioxidant potential is dictated by source material. *Antioxidants*, v. 12, n. 1, p. 203, 2023.

SHIMOMURA, H.; SASHIDA, Y.; OHSHIMA, Y. The chemical components of *Artemisia apiacea* Hance. II. More coumarins from the flower heads. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 28, n. 1, p. 347-348, 1980.

SILVA, D. F. Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Senega boliviensis* A. W. Benn (Polygalaceae). 2015. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2015.

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

SILVA, L. M. et al. Natural acetylcholinesterase inhibitors: application in neurodegenerative disorders. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 137, p. 111375, 2021.

SILVEIRA, D. et al. COVID-19: is there evidence for the use of herbal medicines as adjuvant symptomatic therapy? *Frontiers in Pharmacology*, v. 11, 2020.

SMITH, B. The C-O Bond, Part I: Introduction and the Infrared Spectroscopy of Alcohols. *Spectroscopy* (Online), 2017. Disponível em: <[spectroscopyonline.com/view/c-o-bond-i-introduction-and-infrared-spectra-alcohols-0](http://spectroscopyonline.com/view/c-o-bond-i-introduction-and-infrared-spectra-alcohols-0)>. Acesso em: 10 ago. 2025.

TAIZ, L. et al. *Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017. ISBN 978-85-8271-367-9.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 820 p.

TAN, Nur et al. Antibacterial activities of pyrenylated coumarins from the roots of *Prangos hulusii*. *Molecules*, v. 22, n. 7, p. 1098, 2017.

TEH, S. et al. Two new pyranoxanthones from *Mesua beccariana* (Guttiferae). *Molecules*, v. 15, n. 10, p. 6733-6742, 2010. <https://doi.org/10.3390/molecules15106733>

TEPONNOU, G.; JOUBERT, J.; MALAN, S. Tacrine, trolox and tryptoline as lead compounds for the design and synthesis of multi-target agents for Alzheimer's disease therapy. *The Open Medicinal Chemistry Journal*, v. 11, p. 24, 2017.

TERMENTZI, A.; KEFALAS, S.; 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. Estudo fitoquímico e propriedades biológicas de espécies de *Senega* (Polygalaceae). 2019. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

TOLEDO, A. C. O. et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Revista Lecta*, Bragança Paulista, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, jan./dez. 2003.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. D. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. *Texto & Contexto-Enfermagem*, v. 15, p. 115-121, 2006.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2009.

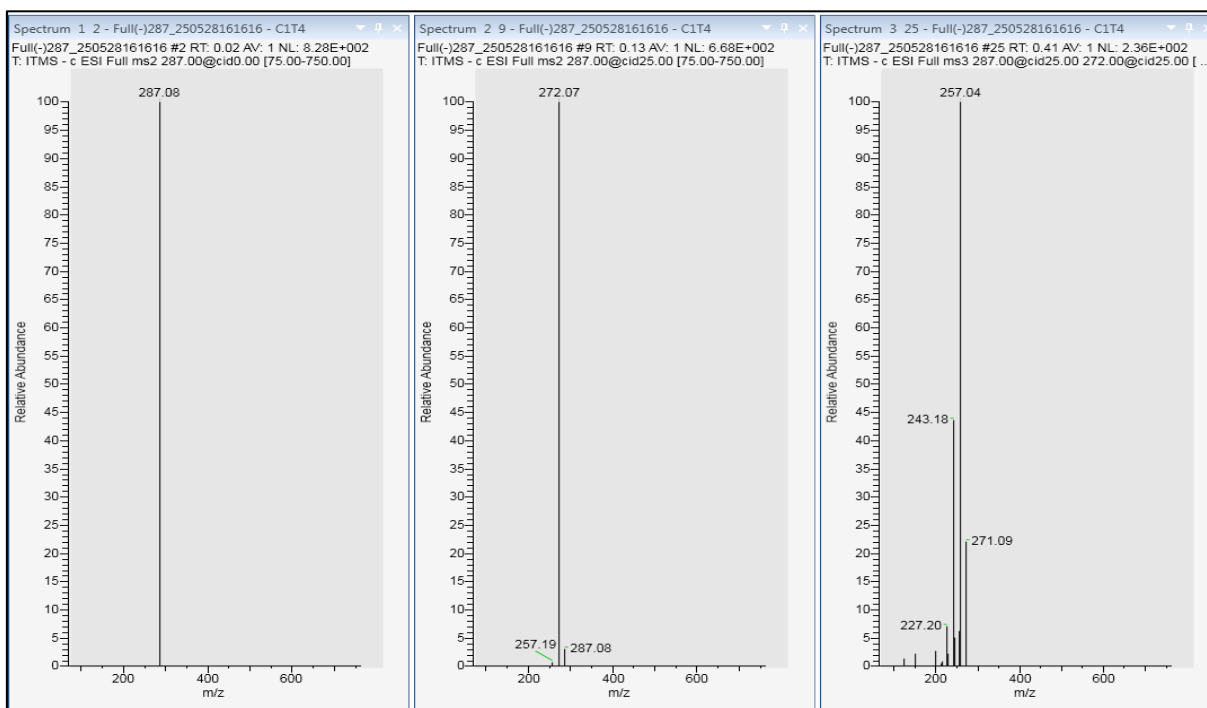
VENZKE, D. Estudo quimiosistemático de espécies do gênero *Senega* e avaliação das propriedades biológicas. 2015. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

VIEGAS, J. R. C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

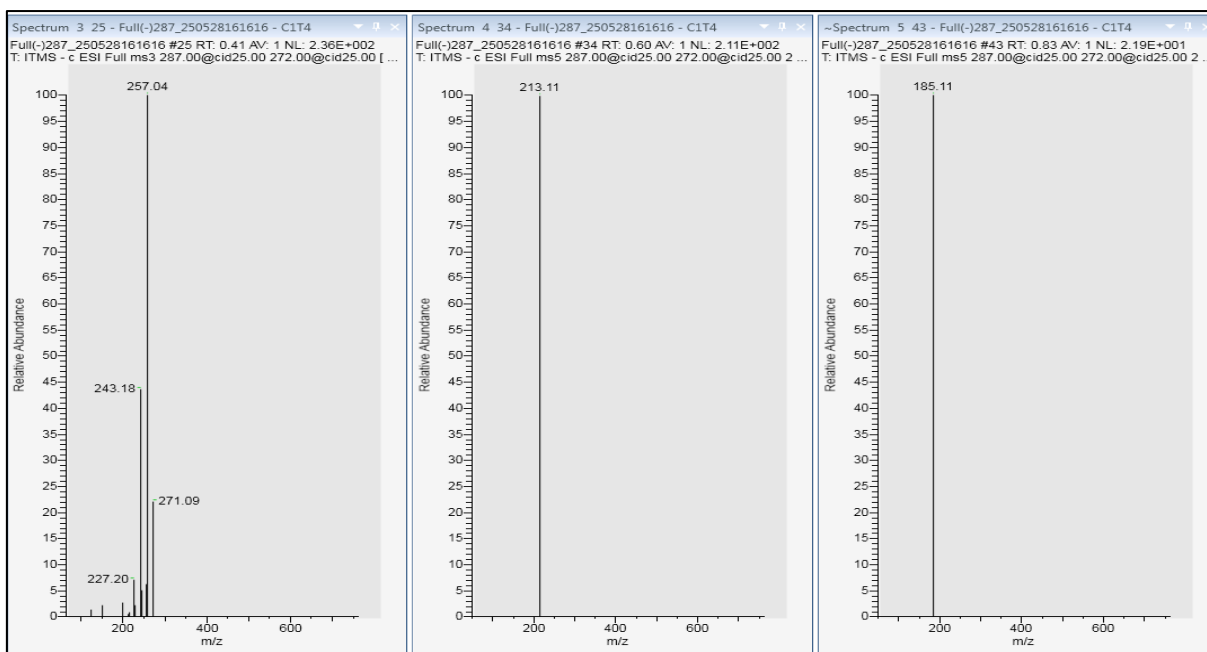
VIJAYALAKSHMI, M.; RUCKMANI, K. Ferric reducing antioxidant power assay in plant extract. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, v. 11, n. 3, p. 570-572, 2016.

- VINITA, K. et al. Scale-up of extraction process for dill seed oil. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v. 16, n. 1, p. 16–27, 1 jan. 2025. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.16(1).16-27.
- VINUTHA, B. et al. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 109, n. 2, p. 359-363, 2007.
- WATERMAN, S. G.; MOLE, S. Analysis of phenolic plant metabolite. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994.
- WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*, v. 313, n. Pt 1, p. 17, 1996. <https://doi.org/10.1042/bj3130017>
- YANG A. et al. Synthesis and Biological Evaluation of Xanthone Derivatives for Possible Treatment of Alzheimer's Disease Based on Multi-Target Strategy. *Chem Biodivers.* 2020 Oct;17(10): e2000442. doi: 10.1002/cbdv.202000442.
- YI, B. et al. Antioxidant phenolic compounds of cassava (*Manihot esculenta*) from Hainan. *Molecules*, 16(12), 10157-10167, 2011.
- YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. 2. ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2014. 281 p.
- ZHANG, D. et al. Studies on the constituents of *Senega japonica* Houtt. I. Structures of Senegasaponins I–X. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 43, n. 1, p. 115-120, 1995.
- ZHANG, D.; et al. Polygalasaponins XLII–XLVI from roots of *Polygala glomerata*. *Phytochemistry*, v. 47, n. 3, p. 459-466, 1998.
- ZHANG, J.; ZHANG, Y.; WANG, J. et al. Recent advances in Alzheimer's disease: Mechanisms, clinical trials and new drug development strategies. Signal transduction and targeted therapy, v. 9, n. 1, p. 211, 2024. DOI: 10.1038/s41392-024-01911-3.
- ZHANG, L. et al. Dual-frequency multi-angle ultrasonic processing technology and its real-time monitoring on physicochemical properties of raw soymilk and soybean protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 80, p. 105803, 2021. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2021.105803.
- ZHANG, S. S. et al. Chemical constituents from the fungus *Amauroderma amoienensis* and their in vitro acetylcholinesterase inhibitory activities. *Planta medica*, v. 79, n. 01, p. 87-91, 2013.
- ZHANG, Z. R. et al. Osthole: a review on its bioactivities, pharmacological properties, and potential as alternative medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, p. 919616, 2015.
- 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. p. 389-440. e-PUB.

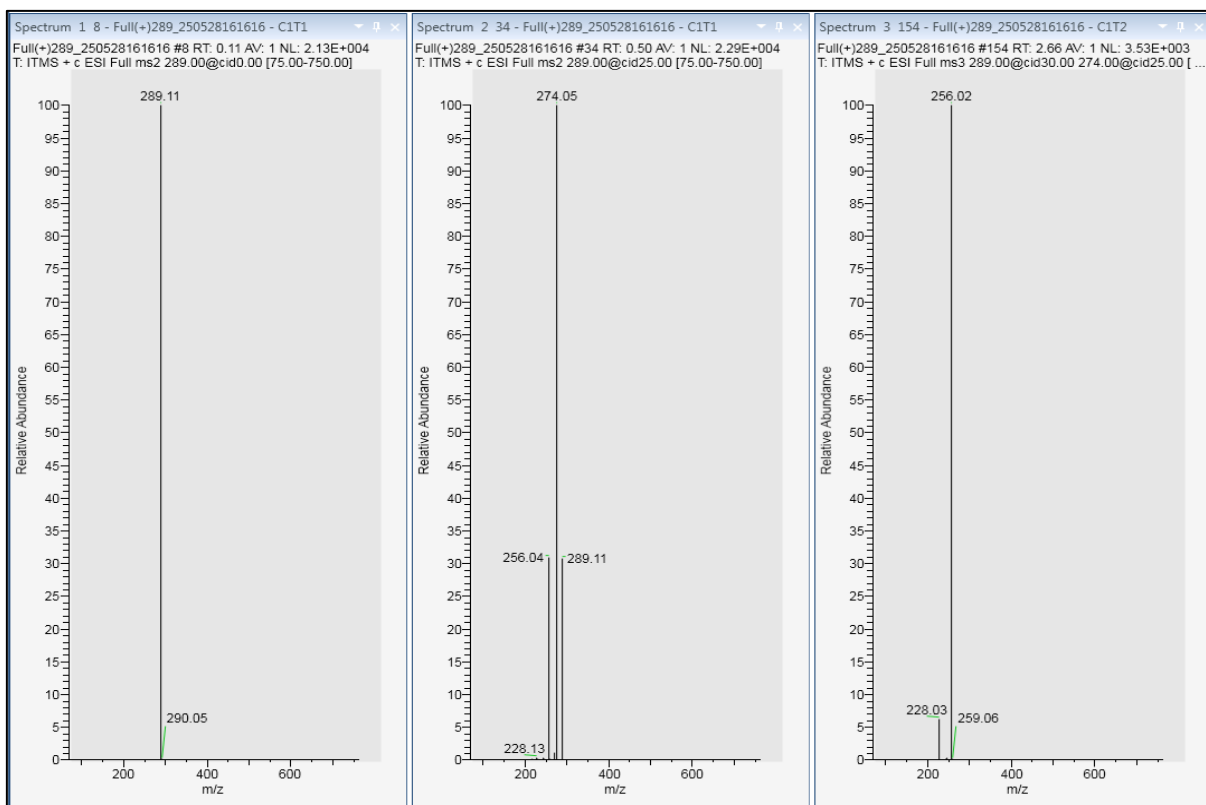
## APÊNDICE A



**Figura 48.** Espectros em modo negativo para  $m/z$  287  $[M-H]^-$  da Substância 4  
Fonte: Elaboração própria

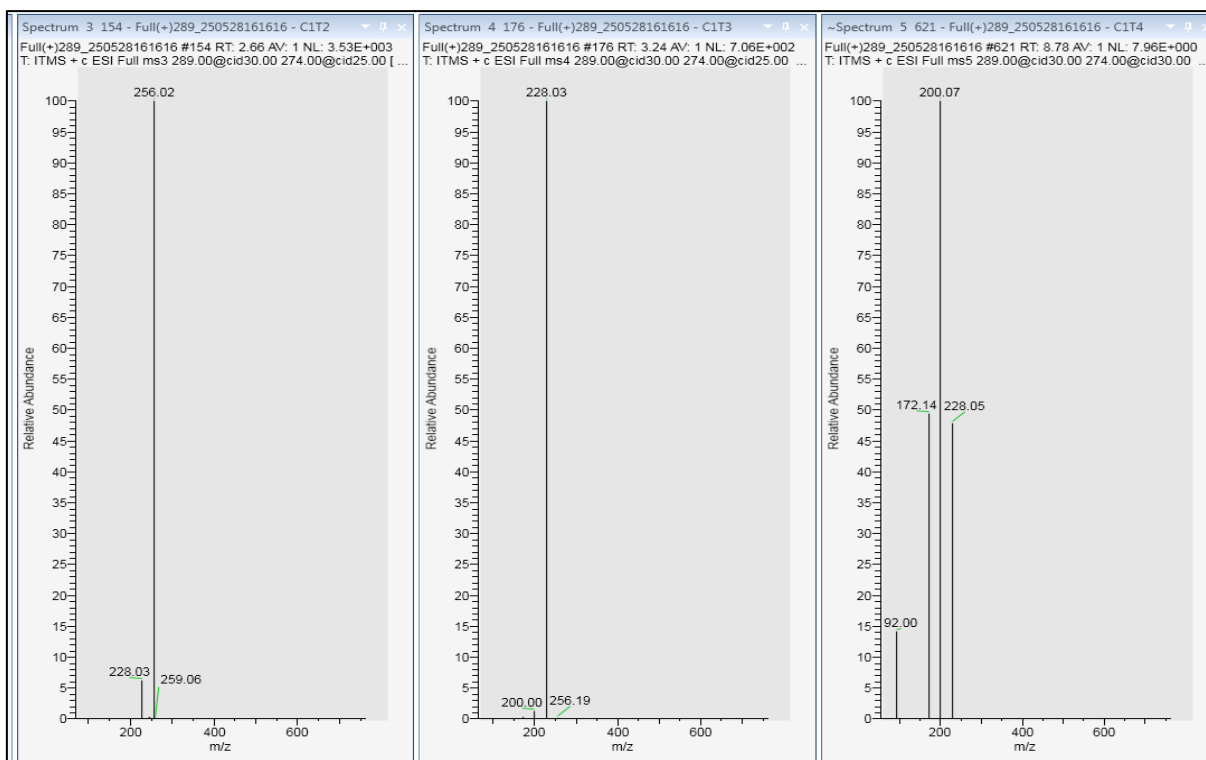


**Figura 49.** Espectros em modo negativo para  $m/z$  287  $[M-H]^-$  da Substância 4  
Fonte: Elaboração própria



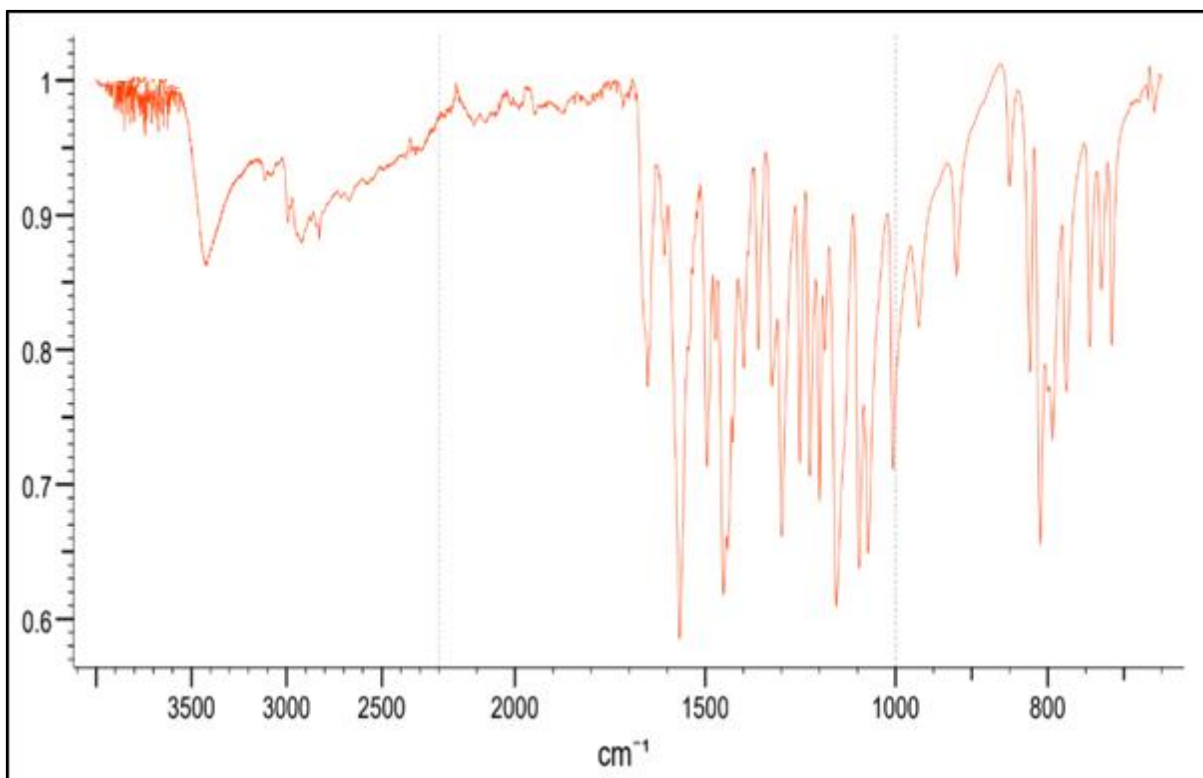
**Figura 50.** Espectros em modo positivo para  $m/z$  289  $[M+H]^+$  da Substância 4

Fonte: Elaboração própria

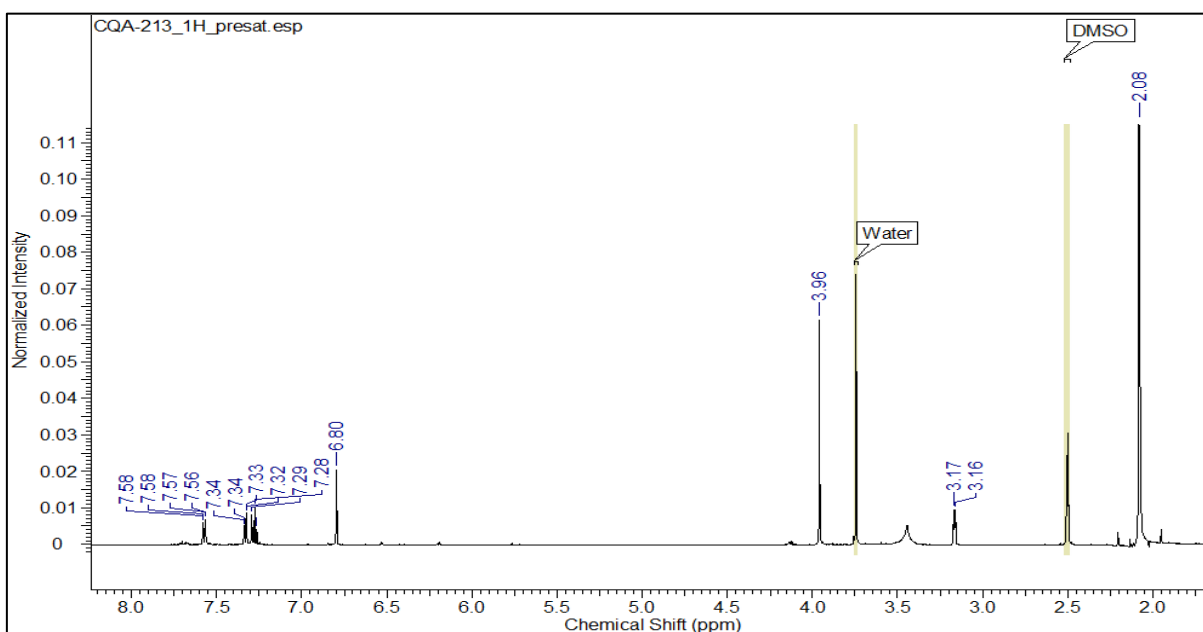


**Figura 51.** Espectros em modo positivo para  $m/z$  289  $[M+H]$  da Substância 4

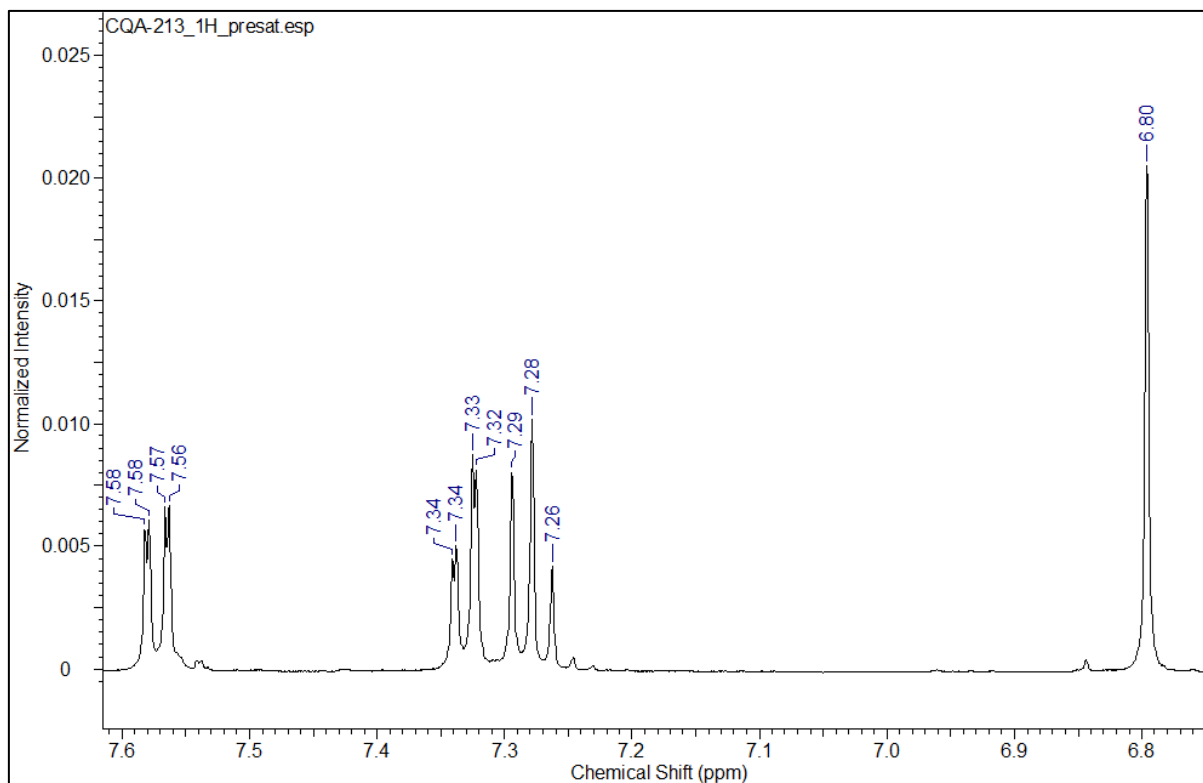
Fonte: Elaboração própria



**Figura 52.** Espectro de infravermelho da Substância **4** isolada na fração acetato de etila  
Fonte: Elaboração própria

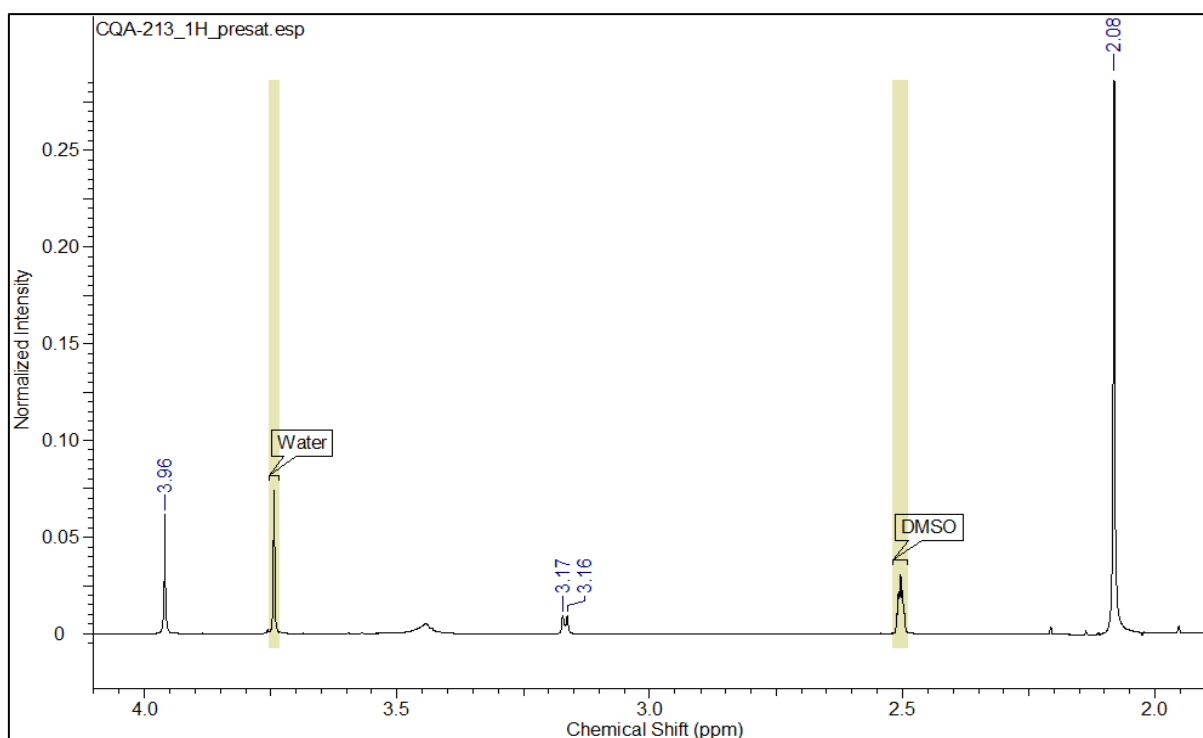


**Figura 53.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da Substância **4** isolada na fração acetato de etila  
Fonte: Elaboração própria



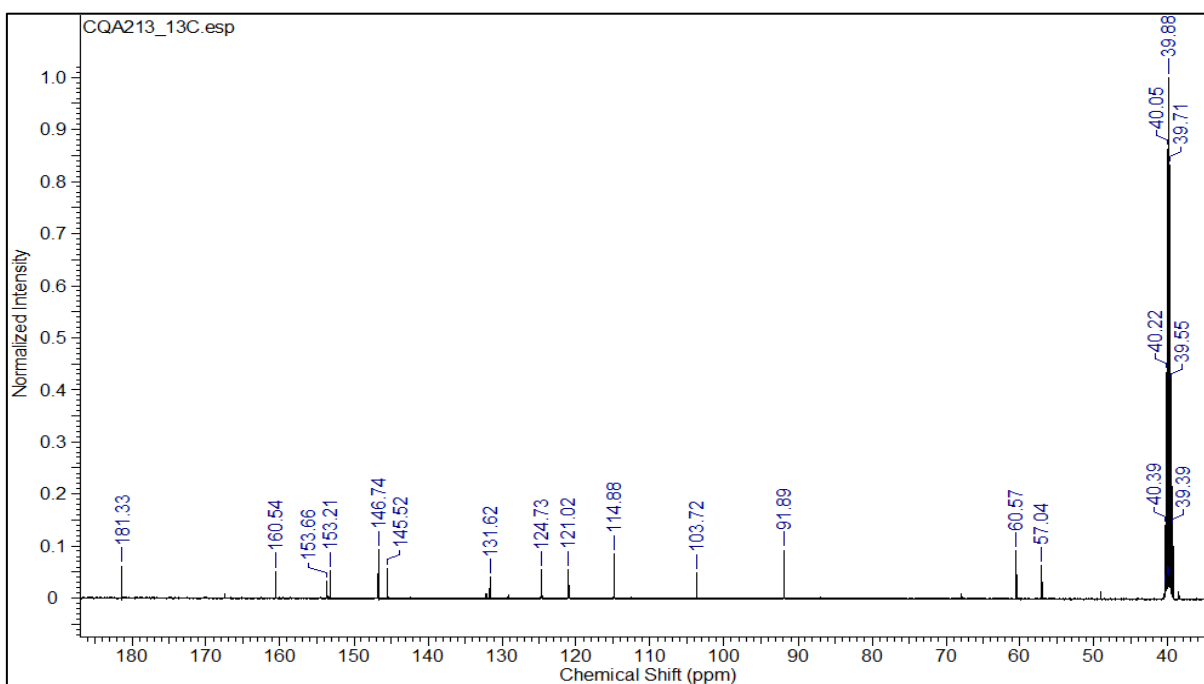
**Figura 54.** Expansão (6,0 – 8,0 ppm) do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância **4** isolada na fração acetato de etila

Fonte: Elaboração própria



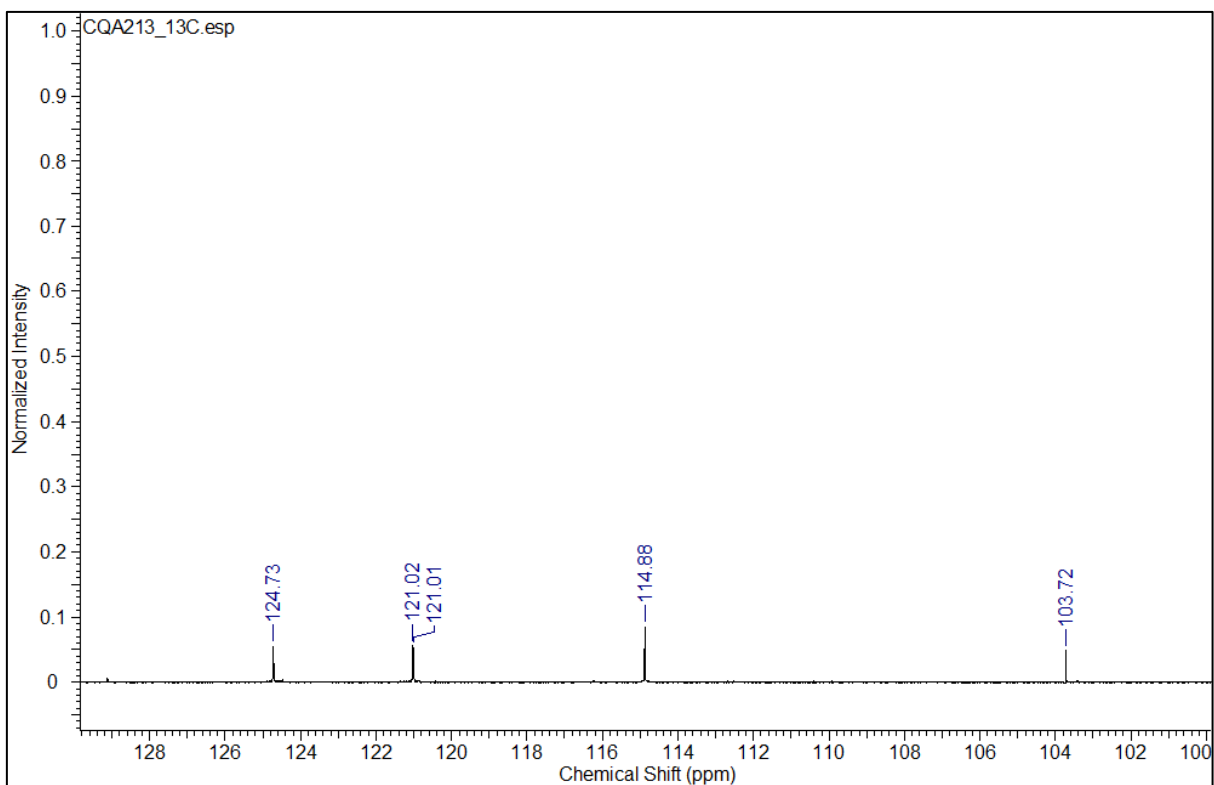
**Figura 55.** Expansão (2,0 – 4,0 ppm) do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância **4** isolada na fração acetato de etila

Fonte: Elaboração própria



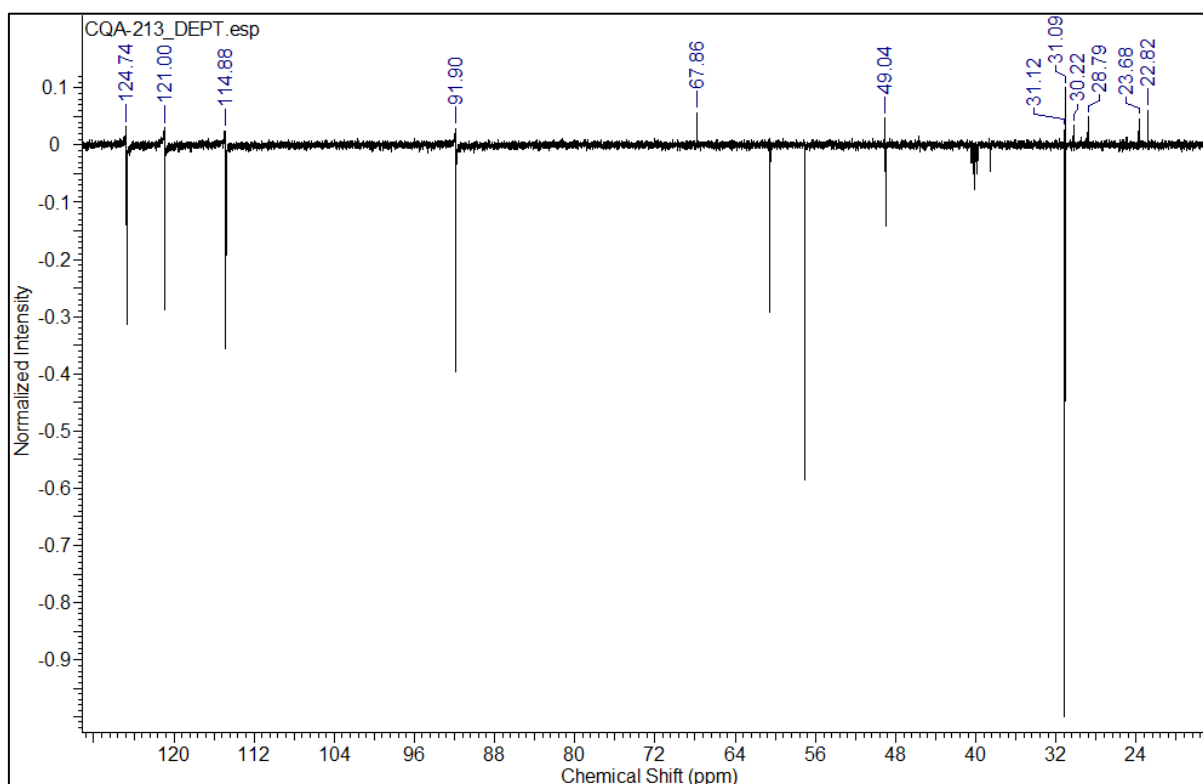
**Figura 56.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância **4** isolada na fração acetato de etila

Fonte: Elaboração própria

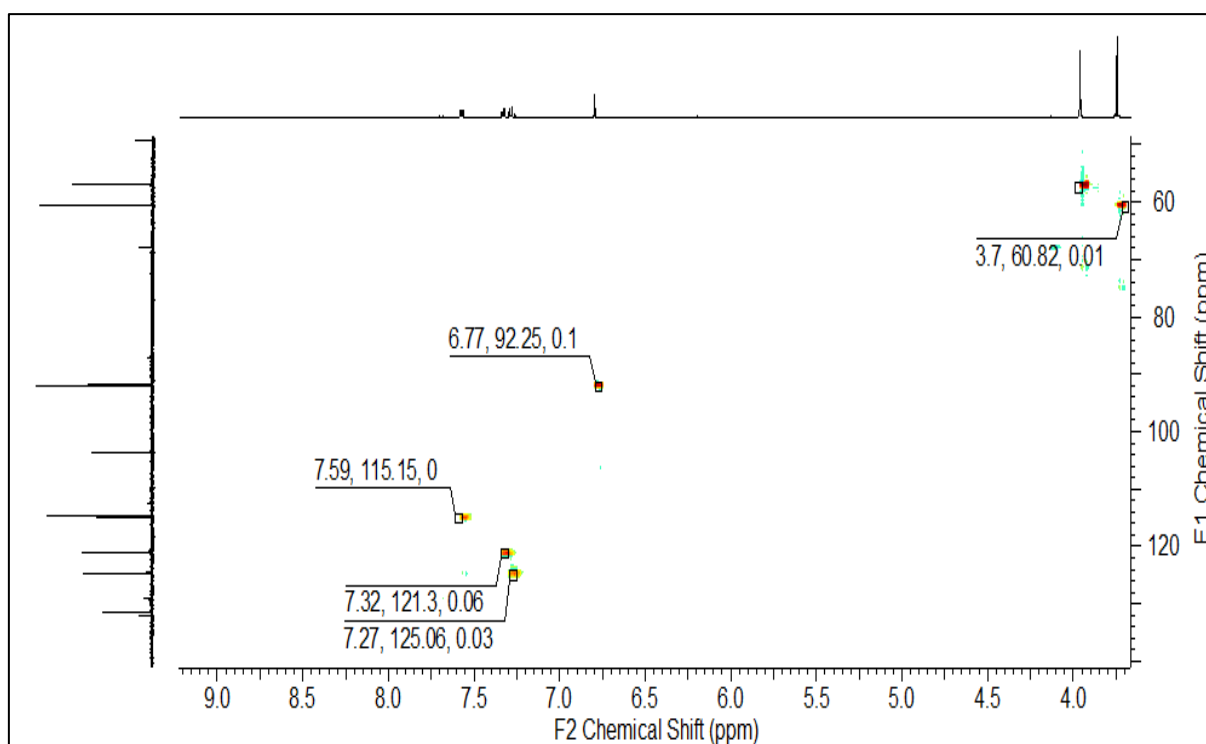


**Figura 57.** Expansão (100- 130 ppm) do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância **4** isolada na fração acetato de etila

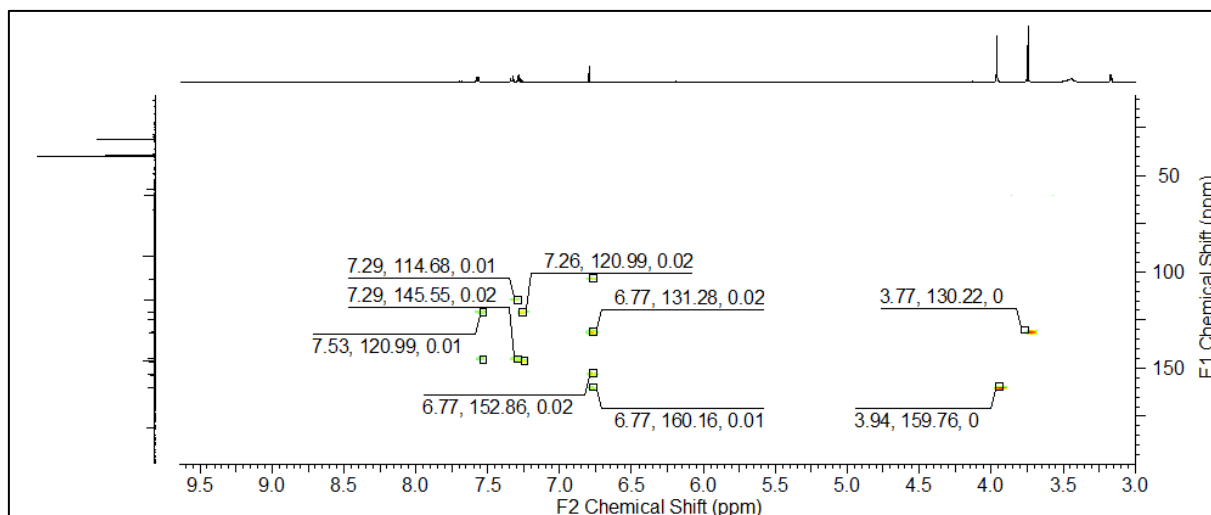
Fonte: Elaboração própria



**Figura 58.** Espectro de DEPT da Substância **4** isolada na fração acetato de etila  
 Fonte: Elaboração própria



**Figura 59.** Espectro de HMQC (500/125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância **4** isolada na fração acetato de etila  
 Fonte: Elaboração própria



**Figura 60.** Espectro de HMBC (500/125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Substância **4** isolada na fração acetato de etila

Fonte: Elaboração própria