

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Nilva Maria Rodrigues Rocha da Silva Passos

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE VOLÁTEIS E
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS FRUTOS DE *Pterodon*
emarginatus VOGEL**

Ribeirão Preto

2024

Nilva Maria Rodrigues Rocha da Silva Passos

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE VOLÁTEIS E
ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS FRUTOS DE *Pterodon*
emarginatus VOGEL**

Tese apresentada a Universidade de Ribeirão Preto –
UNAERP, para obtenção do título de Doutora em
Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia aplicada à saúde
Orientadora: Profa. Dra. Silvia Helena Taleb Contini
Coorientadora: Profa. Dra. Juliana da Silva Coppede

Ribeirão Preto

2024

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

PASSOS, Nilva Maria Rodrigues Rocha da Silva, 1954-

P289a

Orientador: Prof.^a Dr.^a Silvia Helena Taleb Contini

Coorientador: Profa. Dra. Juliana da Silva Coppede.

Tese (Doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,
Biotecnologia, 2024.

1. Sucupira Branca. 2. Citotoxicidade. 3. Inflamação. 4. Atividade
Antimicrobiana. II. Título.

NILVA MARIA RODRIGUES ROCHA DA SILVA PASSOS

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE VOLÁTEIS E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DOS FRUTOS DE *Pterodon emarginatus* VOGEL**


Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde


Data da defesa: 28 de fevereiro de 2024

Resultado: Aprovada


BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **SILVIA HELENA TALEB CONTINI**
Data: 27/03/2024 12:02:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Profa. Dra. Silvia Helena Taleb Contini
Presidente/Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP

Documento assinado digitalmente
 **ANDRE PITONDO DA SILVA**
Data: 06/03/2024 16:56:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. André Pitondo da Silva
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP

Documento assinado digitalmente
 **CAMILA CARLA GUIMARAES**
Data: 26/03/2024 16:05:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Camila Carla Guimarães
Faculdade de Tecnologia do Estado de São Paulo - FATEC

Documento assinado digitalmente
 **LUCAS JUNQUEIRA DE FREITAS MOREL**
Data: 07/03/2024 12:44:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Lucas Junqueira de Freitas Morel
Universidade de Brasília – UNB

Documento assinado digitalmente
 **ADRIANA APARECIDA LOPES**
Data: 08/03/2024 08:08:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Adriana Aparecida Lopes
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP

RIBEIRÃO PRETO
2024

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Ercilia Rodrigues Rocha e ao meu filho Ronan Rocha da Silva Passos, pelo apoio, compreensão, carinho e incentivo constante na minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido saúde e discernimento me mostrando com clareza o caminho que ele me permitiu trilhar.

A Profa. Dra. Sílvia Helena Taleb Contini, pela orientação, paciência inigualável, amizade e pela confiança em mim depositada para a realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira, pela colaboração neste trabalho, por coletar os acessos de *Pterodon emarginatus* e compartilhar conosco seus conhecimentos e experiência.

A Profa Dra Ana Lúcia Fachin por participar deste trabalho como parecerista, dedicando parte do seu tempo a minha pessoa.

As Profas. Dra Adriana Aparecida Lopes e Dra Juliana da Silva Coppede, pelas contribuições no estudo apresentado como membros da banca examinadora do exame geral de Qualificação.

Ao Prof. Dr. André Pitondo da Silva pelo acolhimento em seu laboratório e contribuição nos ensaios de atividade antimicrobiana.

Ao meu ex aluno e doutorando, Miguel Augusto de Moraes, pela parceria, companherismo, disponibilidade e contribuição neste trabalho.

Ao mestrando Andrews Borges e em especial ao Prof. Dr. Carlos Arterio Sorgi do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP, por disponibilizar o laboratório para a realização dos ensaios de citotoxicidade e anti-inflamatorios *in vitro*.

Ao meu companheiro, Paulo Roberto Testa pelo apoio e compreensão nos momentos mais difíceis durante a elaboração deste trabalho.

A todos, obrigada.

*“Comece devagar,
porque a direção é mais
importante que a
velocidade”*

Clarice Lispector

RESUMO

A espécie arbórea *Pterodon emarginatus* Vogel, nativa do Cerrado brasileiro, conhecida na medicina popular como “sucupira-branca” é popularmente utilizada nas formas de extratos alcoólicos, preparados a partir dos frutos, na forma farmacêutica tintura. Estudos da composição química de constituintes presentes em plantas medicinais com ações antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória são imprescindíveis para garantir a eficácia e a segurança do medicamento que será distribuído para a população. Neste trabalho, os constituintes voláteis extraídos dos frutos de *P. emarginatus*, coletados em quatro regiões brasileiras, foram analisados por CG-EM e o potencial antimicrobiano, antioxidante e anti-inflamatório dos extratos oleaginosos foram avaliados. A investigação da atividade antimicrobiana foi direcionada para linhagens específicas. Foram testadas linhagens bacterianas de diferentes espécies da American Type Culture Collection (ATCC) que fazem parte do grupo denominado ESKAPE. Os extratos não apresentaram atividade nas concentrações e avaliadas. Os constituintes voláteis majoritários identificados nos frutos de *P. emarginatus*, utilizando a técnica HS-SPME-CG-EM, foram: trans-cariofileno, β -elemene e α -himachalene. Nos extratos oleaginosos dos frutos de *P. emarginatus* foram identificados os diterpenoides geranilgeraniol e 14,15-epoxygeranilgeraniol, além do diterpeno vouacapano 6 α -hidroxi-7 β -acetoxivouacapan-17 β -oato de metila. Quanto a atividade antioxidante, os extratos oleaginosos de *P. emarginatus* foram capazes de reduzir o radical DPPH em 50 % nas concentrações de 10,39 a 49,25 mg/mL. Foi utilizado o padrão rutina, como controle positivo ($IC_{50} = 11,5 \mu\text{g/mL}$). A viabilidade das células frente aos extratos foi avaliada através do ensaio de MTT, utilizando uma placa de 96 poços utilizando a linhagem monocítica THP-1 diferenciada em macrófago. Efeito citotóxico foi observado nas concentrações 1250 e 125 $\mu\text{g/mL}$. A partir do sobrenadante do ensaio de viabilidade celular foi dosado a concentração das citocinas IL-1 β usando os KITS ELISA seguindo as instruções do fabricante BD Pharmacy®. Constatou-se a atividade pró-inflamatória em células TPH-1. Os resultados obtidos neste trabalho, reforçam a necessidade da prospecção de extratos oleaginosos, obtidos a partir dos frutos de *P. emarginatus*, que apresentem propriedades antibacterianas, antioxidantes e anti-inflamatórias.

Palavras-chave: Frutos; Sucupira-branca; Citotoxicidade; Inflamação; Atividade Antimicrobiana.

ABSTRACT

The tree species *Pterodon emarginatus* Vogel, native to the Brazilian Cerrado and commonly known in folk medicine as "sucupira-branca," is widely used in the form of alcoholic extracts prepared from its fruits, specifically in the pharmaceutical form of tincture. Studies on the chemical composition of constituents present in medicinal plants with antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory actions are essential to ensure the efficacy and safety of the medication that will be distributed to the population. In this study, the volatile constituents extracted from the fruits of *P. emarginatus*, collected from four Brazilian regions, were analyzed by GC-MS, and the antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory potential of the oil extracts was evaluated. The investigation of antimicrobial activity was directed towards specific strains. Bacterial strains from different species of the American Type Culture Collection (ATCC) that are part of the group known as ESKAPE were tested. The extracts showed no activity at the evaluated concentrations. The major volatile constituents identified in the fruits of *P. emarginatus*, using the HS-SPME-GC-MS technique, were: trans-caryophyllene, β -elemene, and α -himachalene. In the oil extracts of the fruits of *P. emarginatus*, the diterpenoids geranylgeraniol and 14,15-epoxy-geranylgeraniol were identified, along with the diterpene vouacapano 6 α -hydroxy-7 β -acetoxylvouacapan-17 β -methyl ester. Regarding the antioxidant activity, the oil extracts of *P. emarginatus* were able to reduce the DPPH radical by 50% at concentrations ranging from 10.39 to 49.25 mg/mL. Rutin was used as a positive control (IC₅₀ = 11.5 μ g/mL). The viability of the cells in response to the extracts was assessed using the MTT assay, employing a 96-well plate with the monocytic THP-1 lineage differentiated into macrophages. Cytotoxic effects were observed at concentrations of 1250 and 125 μ g/mL. From the supernatant of the cell viability assay, the concentration of the cytokine IL-1 β was measured using ELISA kits following the manufacturer's instructions from BD Pharmacy®. Pro-inflammatory activity was found in THP-1 cells. The results obtained in this study reinforce the need for the prospecting of oil extracts derived from the fruits of *P. emarginatus* that exhibit antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory properties.

Keywords: Fruits; White Sucupira; Cytotoxicity and Inflammation; Antimicrobial Activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Reação do MTT com enzima mitocondrial redutase -----	21
Figura 2 -	Espécie vegetal arbórea de <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel -----	24
Figura 3 -	Fruto de <i>Pterodon emarginatus</i> cortada ao meio com evidência da estrutura alveolar contendo o óleo característico da espécie-----	25
Figura 4 -	Frutos de Sucupira Branca - <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel-----	26
Figura 5 -	Esquema das placas do teste de CIM -----	35
Figura 6 -	Esquema da placa de 96 poços para ensaio de viabilidade celular --	38
Figura 7 -	Placas com sementeira de <i>Klebsiella pneumoniae</i> PDR com leitura pela resazurina -----	44
Figura 8 -	Concentração inibitória mínima para Vancomicina -----	45
Figura 9 -	Gráfico estatístico da viabilidade com tratamento do extrato de Rifaina -----	48
Figura 10 -	Gráfico estatístico da viabilidade com tratamento do extrato de Araxá -----	49
Figura 11 -	Gráfico estatístico da viabilidade com tratamento do extrato de Rifaina + LPS -----	51
Figura 12 -	Gráfico estatístico da viabilidade com tratamento do extrato de Araxá + LPS -----	51
Figura 13 -	Gráficos estatísticos da viabilidade das células THP-1 expostas aos extratos de <i>Pterodon emarginatus</i> de Rifaina – SP-----	52
Figura 14 -	Gráficos estatísticos da viabilidade das células THP-1 expostas aos extratos de <i>Pterodon emarginatus</i> de Altinópolis – SP-----	53
Figura 15 -	Gráficos estatísticos da viabilidade das células THP-1 expostas aos extratos de <i>Pterodon emarginatus</i> de Inocência – MS-----	54
Figura 16 -	Gráfico estatístico da expressão da interleucina 1 β por células THP-1, submetidas aos extratos E1 (Altinópolis-SP); E2 (Rifaina-SP) e E3 (Araxá-MG), expostas ou não ao polilipossacarídeo (LPS) -----	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Descrição das bactérias testadas -----	33
Tabela 2-	Análise dos constituintes voláteis dos frutos de <i>Pterodon emarginatus</i> por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, CG-EM -----	41
Tabela 3-	Concentrações de extratos oleaginosos utilizadas nas placas de poço para avaliação do CIM -----	43
Tabela 4-	Concentração inibitória mínima para vancomicina-----	46
Tabela 5-	Resultados da atividade antioxidante dos extratos oleaginosos de <i>P. emarginatus</i> , expressa pela porcentagem de sequestro de radicais DPPH• -----	46
Tabela 6-	Média das viabilidades celular pós-tratamento com os extratos	48
Tabela 7-	Média das viabilidades celular pós-tratamento com os extratos + LPS -----	50
Tabela 8-	Média das leituras de absorvância pós-tratamento extratos + LPS -----	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection

BHI: Brain Heart Infusion (meio de cultura líquido, infusão cérebro e coração)

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLSI: Clinical and Laboratory Standard Institute

CG: Cromatografia Gasosa

CG-EM: Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

DMEM: meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPPH•: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

IC₅₀: Concentração suficiente para neutralizar 50% do radical DPPH•

LPS: solução de Lipopolissacarídeos

MTT: brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

PBS: Tampão fosfato salino

PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate

SFB: soro fetal bovino

SPME: Microextração em Fase Sólida

THP-1: linhagem celular monocítica humana

VOCs: Constituintes Orgânicos Voláteis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	19
2.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR OU ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	20
2.3 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	22
2.4 FAMÍLIA LEGUMINOSAE.....	23
2.5 GÊNERO <i>Pterodon</i>	23
2.6 ESPÉCIE <i>Pterodon emarginatus</i> VOGEL.....	24
2.7 CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE <i>Pterodon emarginatus</i> VOGEL	26
3 JUSTIFICATIVA.....	28
4. HIPÓTESE	29
5. OBJETIVOS.....	30
5.1 OBJETIVO GERAL.....	30
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
6 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
6.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	31
6.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO OLEAGINOSO	31
6.3 ANÁLISE DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS DOS FRUTOS DE <i>Pterodon emarginatus</i> POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS - GC-MS	31
6.4 BACTÉRIAS DO ESTUDO	32
6.4.1 Avaliação da Atividade Antimicrobiana	32

6.4.2 Cultivo dos Microrganismos e Preparo do Inóculo	34
6.4.3 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima.....	34
6.5 ENSAIO ANTIOXIDANTE IN VITRO: DPPH• DOS EXTRATOS OLEAGINOSOS DE <i>P. emarginatus</i>	36
6.6 PREPARO IN VITRO DA CULTURA CELULAR DA LINHAGEM MONOCÍTICA HUMANA THP-1.....	37
6.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA	37
6.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	39
6.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
7.1 ANÁLISE DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS DOS FRUTOS DE <i>Pterodon emarginatus</i> POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS - CG-EM	41
7.2 CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS OLEAGINOSOS de <i>P. emarginatus</i> PARA A AVALIAÇÃO DO CIM	43
7.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA NAS PLACAS DE TESTES DA CIM.....	44
7.4 ENSAIO DE SUSCEPTIBILIDADE PARA O ANTIMICROBIANO VANCOMICINA	45
7.5 ENSAIO ANTIOXIDANTE POR REDUÇÃO DO RADICAL DPPH•.....	46
7.6 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E CITOTOXICIDADE.....	47
7.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	54
8 CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS	58
APÊNDICES	65

APÊNDICE 1- CROMATOGRAMA OBTIDO POR HS-SPME-GC-MS DOS FRUTOS DE <i>P. ermagnatus</i> COLETADOS EM ALTINÓPOLIS/SP	65
APÊNDICE 2- CROMATOGRAMA OBTIDO POR HS-SPME-GC-MS DOS FRUTOS DE <i>P. ermagnatus</i> COLETADOS EM RIFAINA/SP	65
APÊNDICE 3- CROMATOGRAMA OBTIDO POR HS-SPME-GC-MS DOS FRUTOS DE <i>P. ermagnatus</i> COLETADOS EM ARAXÁ/MG	66
APÊNDICE 4- CROMATOGRAMA OBTIDO POR HS-SPME-GC-MS DOS FRUTOS DE <i>P. ermagnatus</i> COLETADOS EM INOCÊNCIA/MS	66
APÊNDICE 5- ESPECTRO DE MASSAS DE SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS..	67
APÊNDICE 6- CROMATOGRAMA OBTIDO POR GC-MS DOS EXTRATOS OLEAGINOSOS DE <i>P. ermagnatus</i> - ARAXÁ/MG	70
APÊNDICE 7. ESPECTRO DE MASSAS DA DO DITERPENÓ 6A-HIDROXI-7B-ACETOXIVOUACAPAN-17B-OATO DE METILA.....	71
APÊNDICE 8- CROMATOGRAMA OBTIDO POR GC-MS DOS EXTRATOS OLEAGINOSOS DE <i>P. ermagnatus</i> - RIFAINA/SP	72
APÊNDICE 9- ESPECTRO DE MASSAS DO DITERPENÓIDE GERANILGERANIOL	73
APÊNDICE 10- ESPECTRO DE MASSAS DO DITERPENÓIDE 14,15-EPOXY-GERANILGERANIOL	74
APÊNDICE 11- CROMATOGRAMA OBTIDO POR GC-MS DOS EXTRATOS OLEAGINOSOS DE <i>P. ermagnatus</i> - ALTINÓPOLIS/SP	75
APÊNDICE 12- CROMATOGRAMA OBTIDO POR GC-MS DOS EXTRATOS OLEAGINOSOS DE <i>P. ermagnatus</i> - INOCÊNCIA/MS	76

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento tradicional do uso de plantas medicinais, aliado ao desenvolvimento da ciência e da tecnologia, tem despertado o interesse científico envolvendo o estudo da composição química e avaliação do potencial terapêutico dos extratos brutos produzidos a partir de espécies vegetais, buscando caminhos para o controle e tratamento de diversas doenças (Veiga Jr; Pinto, 2005).

Segundo dados da Conferência da Alma-Ata, na década de 70, cerca de 80% da população mundial faz uso de medicamentos produzidos a partir matérias-primas vegetais, o que demonstra a importância da descoberta de fármacos à base de plantas, pois podem fornecer subsídios contra vários alvos farmacológicos. O interesse maior ocorre sobre plantas que possuem uso tradicional consolidado, devido ao fato de apresentarem fortes indícios de efetividade (Ferreira, 2006; Moresco, 2017).

É importante considerar que mudanças nas condições climáticas, fatores genéticos e ambientais afetam as vias do metabolismo secundário das espécies vegetais (Bakkali *et al.*, 2008). Deste modo, o número de compostos, suas quantidades relativas e o rendimento de extrato bruto, obtido de uma mesma espécie vegetal poderá variar, significativamente, resultando em diferenças nas propriedades farmacológicas e terapêuticas da planta (Farhadia *et al.*, 2020).

Conhecer a composição química das matérias-primas ativas vegetais, utilizadas na elaboração de medicamentos fitoterápicos, é um passo de extrema importância para que o produto obtido tenha qualidade, segurança e eficácia. Atualmente, existem técnicas analíticas instrumentais que possibilitam caracterizar os constituintes químicos de interesse medicinal, sendo a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) a técnica utilizada para a separação, identificação e quantificação de mistura de substâncias voláteis (Farhadia *et al.*, 2020; Vasconcelos *et al.*, 2014).

O perfil cromatográfico é útil para facilitar a identificação química de matérias-primas de origem vegetal, sendo exigido a análise de droga vegetal e derivado vegetal. Constitui também uma exigência para produtos acabados no momento do registro, renovação do registro ou notificação, e em algumas petições pós registro. Este, quando obtido em condições estabelecidas previamente, pode servir de auxílio na identificação e diferenciação de diferentes espécies vegetais (Brasil, 2014).

Entre as espécies vegetais que podem apresentar ações antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória está a “Sucupira-branca”, identificada botanicamente como *Pterodon emarginatus* Vogel (Duarte, 2006; Neves *et al.*, 2007).

Populações fazem uso dos frutos da *Pterodon emarginatus* Vogel em macerações alcoólicas para tratar vários tipos de afecções inflamatórias das vias aéreas superiores (Bustamante *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2014).

Neste estudo, extratos oleaginosos (hidroalcoólicos) obtidos dos frutos de *P. emarginatus* Vogel de quatro regiões brasileiras foram avaliados quanto às atividades antimicrobiana, antioxidante, viabilidade celular e anti-inflamatória.

Diante do exposto, observa-se a necessidade de realizar estudos químicos e novos ensaios com extratos oleaginosos obtidos dos frutos da *Pterodon emarginatus* Vogel, coletadas em diferentes regiões do Brasil, com o objetivo de determinar quais são os marcadores químicos dos diferentes quimiotipos e relacioná-los com as atividades de seus respectivos extratos propostas neste estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As plantas são uma importante fonte de substâncias ativas para o tratamento de muitas enfermidades. Espécies vegetais dos biomas brasileiros são utilizadas pelas populações para tratar diversas doenças, incluindo infecções bacterianas e fúngicas (Bastos *et al.*, 2011).

Os metabólitos secundários das plantas apresentam propriedades antimicrobianas incluindo fenóis, alcaloides, flavonoides e terpenóides (Chandra *et al.*, 2017).

Assim, a pesquisa com plantas medicinais ou metabólitos secundários derivados das mesmas pode fornecer dados para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas às infecções microbianas (Oliveira, 2018).

Para a determinação da atividade antibacteriana de derivados vegetais existem vários métodos. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição (Chandra *et al.*, 2017; Oliveira, 2018).

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), estudos têm utilizado o método de microdiluição em placas, seguindo as normas descritas pelo Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2016) (Garzon *et al.*, 2015; Oliveira, 2018).

Dutra *et al.* em 2009 demonstraram que o óleo essencial obtido das sementes de *P. emarginatus* inibiu o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 e apresentou expressiva atividade *in vitro* contra *Leishmania amazonensis*.

Ferreira; Dantas; Catão (2014) avaliaram a possível atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Pterodon emarginatus* Vogel frente às cepas bacterianas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922. A atividade antimicrobiana foi determinada utilizando o método de difusão em meio sólido, pela técnica de *pour plate*, usando o óleo essencial puro (100 %) e nas seguintes diluições: 32 %, 16 %, 8 %, 4 %, 2 %, 1 % e 0,5 %. Nenhuma das concentrações testadas do óleo essencial formou halo de inibição para as cepas estudadas.

Machado *et al.* (2017) investigaram novas drogas antimicobacterianas para o programa de erradicação da tuberculose e de outras doenças relacionadas com micobactérias. Os ensaios foram realizados em microplacas com resazurina (corante) contra duas espécies do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e 3 espécies de micobactérias não tuberculosas. Os resultados mostraram o extrato hexânico e o óleo essencial de frutos de *Pterodon*

emarginatus como potenciais fontes para drogas antimicobacterianas contra quatro espécies de micobactérias testadas.

Sabe-se que pacientes que apresentam infecções resistentes tem um custo muito maior para a Saúde Pública do que aqueles com infecções não resistentes, devido a um maior tempo de recuperação, duração do agravo, necessidade de testes adicionais e o uso de fármacos de alto custo. Isto leva a necessidade da descoberta de novos agentes antimicrobianos para tratar ou controlar doenças infecciosas (Oliveira 2018).

2.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes são substâncias que impedem a formação de radicais livres ou impedem a etapa de propagação dessas reações doando hidrogênio de forma que a molécula alvo fique estável, agindo no retardo ou na prevenção da oxidação (Soares, 2002; Broinizi *et al.*, 2007).

Por outro lado, os radicais livres são moléculas liberadas pelo metabolismo do organismo com elétrons altamente instáveis e reativos, que podem causar doenças degenerativas, envelhecimento e morte celular. Podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana. O seu alvo celular, proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA está relacionado com o seu sítio de formação (Vasconcelos *et al.*, 2014).

Os seres vivos podem sofrer frequentemente a ação de radicais livres. A ação destes radicais livres gera reações de oxidação, e estudos mostraram que essas reações estão ligadas a doenças como câncer, aterosclerose, diabetes, artrite, malária, AIDS, doenças cardiovasculares e doenças do envelhecimento (Nascimento, 2016).

Os vegetais são considerados fonte de metabólitos que apresentam atividade antioxidante. Dentre esses metabólitos estão os compostos fenólicos que podem ser classificados entre flavonoides e não flavonoides. Os compostos fenólicos apresentam grupos benzênicos que possuem pelo menos um de seus hidrogênios substituídos por um grupamento hidroxila (Soares *et al.*, 2008).

Na dieta da população mundial, os chás feitos a partir do método de infusão, auxiliam na extração dos compostos fenólicos (Gonçalves *et al.*, 2015). Diversos estudos evidenciam o efeito protetor contra as espécies reativas de oxigênio e aos danos causados pelas mesmas,

devido ao consumo destes chás, e estes efeitos têm sido atribuído à presença de compostos antioxidantes, que são produtos secundários do metabolismo vegetal (Gonçalves *et al.*, 2015, Nascimento, 2016).

O interesse específico pelos antioxidantes naturais teve início nos anos 80, diante da comprovação de efeitos maléficos causados por doses elevadas de antioxidantes sintéticos como o BHT (butil-hidroxi-tolueno) e o t-BHQ (t-butil hidroquinona) (Gonçalves *et al.*, 2015).

Assim, estudos foram voltados para a identificação de novos compostos com atividade antioxidante, provenientes de fontes naturais, para atuação ou sinergicamente com outros aditivos, como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e limitar o uso dos antioxidantes sintéticos (Soares *et al.*, 2008).

Os extratos oleaginosos de frutos de *P. emarginatus* têm demonstrado potencial antioxidante. Eles podem conter substâncias capazes de doar elétrons e reduzir radicais livres, como observado em testes com o radical livre estável 1,1-difenil-2-DPPH•) (Rocha, Kaplan, 2006).

2.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR OU ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Entende-se por ensaio de viabilidade celular ou ensaio de citotoxicidade um teste que analisa células metabolicamente ativas em uma cultura celular, a fim de avaliar sua atividade qualitativa e quantitativamente (Rogerio, 2000).

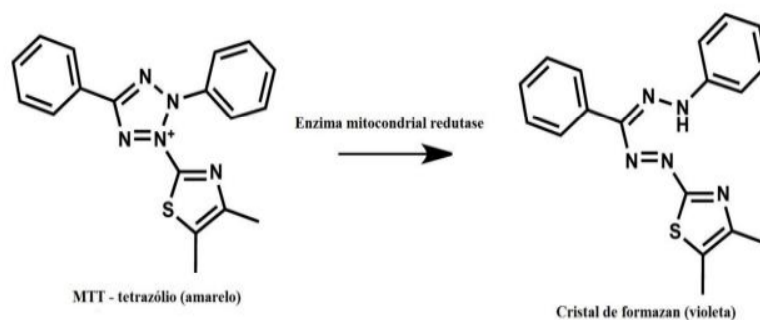
Ensaio de viabilidade celular são frequentemente usados para triar moléculas que possuem efeitos na proliferação celular ou efeitos tóxicos que podem conduzi-las a morte. Muitos desses ensaios são realizados em placas de titulação de 96 "poços", de forma que vários compostos podem ser triados ao mesmo tempo (Rogerio, 2000; Bochnie, Gregório, Maciel, 2017).

Vários ensaios de viabilidade celular ou de citotoxicidade estão disponíveis atualmente, cada um deles utiliza uma abordagem específica para detectar diferentes aspectos da viabilidade celular, como integridade celular. Entre estes ensaios os colorimétricos como o ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), é utilizado para medir a viabilidade e proliferação celular, bem como a citotoxicidade (Rogerio, 2000; Bochnie, Gregório, Maciel, 2017).

O ensaio de MTT baseia-se na comprovação da citotoxicidade induzida por um determinado composto ou toxina no metabolismo celular de glicídeos, usualmente através da avaliação da atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais (enzima mitocondrial redutase) e do seu respectivo potencial redox (Solez, 2007).

A viabilidade é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água), pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADHP, a formazan (um sal de coloração roxa e insolúvel em água) (figura 6). A viabilidade é quantificada pela redução do MTT (um sal de coloração amarela), pela atividade metabólica celular a formazan (um sal de coloração violeta) (Bochnie, Gregório, Maciel, 2017).

Figura 1 - Reação do MTT com a enzima mitocondrial redutase.



Fonte: Stoddart, 2011

Os cristais de formazan insolúveis são dissolvidos usando uma solução de solubilização e a solução colorida resultante é quantificada através da medida de sua absorvância em 500-600 nanômetros usando um espectrofotômetro para placas multipoços (Stoddart, 2011; Santos, 2021).

Este ensaio pode ser usado para várias aplicações, como por exemplo, quantificação de crescimento e viabilidade celular, medição da proliferação celular em resposta a fatores de crescimento, citocinas e nutrientes, medição de citotoxicidade, e para estudar a ativação celular (Santos, 2021).

2.3 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

A inflamação é um mecanismo de defesa de organismos superiores em resposta a lesões teciduais, produtos químicos nocivos ou patógenos, para erradicar os agentes patogênicos invasores e remover substâncias irritantes (Munn, 2016, Oliveira, 2018).

No processo inflamatório, o agente inflamatório age sobre os tecidos, induzindo a liberação de mediadores da inflamação por células do hospedeiro para o local da inflamação. Estes mediadores podem ser químicos ou biológicos e irão controlar as características fisiológicas daquele local, a fim de remover o agente causal e restabelecer as condições normais (Cardinal *et al.*, 2016; Rosa, 2021).

Os mediadores biológicos envolvidos neste processo inflamatório são as diferentes células do sistema imune como, por exemplo, os leucócitos. Dentre os leucócitos, destacam-se os monócitos que, nos tecidos se diferenciam em macrófagos. Há também as citocinas que são proteínas ou glicopeptídeos produzidos por diferentes células, como os macrófagos, que agem como sinalizadores celulares, permitindo a comunicação e deslocamento das células do sistema imune. Existem diferentes tipos de citocinas, que podem ser classificadas de acordo com suas diferentes estruturas, funções, e sítios de atuação no organismo, como por exemplo, as interleucinas (IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , etc.) (Rosa, 2021).

Algumas citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 entre outras, são conhecidas como pró-inflamatórias, ou seja, o aumento de seus níveis resulta no aumento nas respostas inflamatórias do organismo (Zhang, 2007; Rosa, 2021).

O mecanismo de ação de cada citocina no organismo envolve diferentes células e outros mediadores inflamatórios de modo sistêmico, ou seja, o aumento ou diminuição dos níveis de uma acarretará na mudança nos níveis de outros mediadores. Assim, as citocinas apresentam mecanismos de ação distintos e complexos nos processos inflamatórios (Kany, Vollrath, Relja, 2019).

Dentre os mediadores inflamatórios e vias celulares que têm sido estudados em associação com processos fisiopatológicos destacam-se as citocinas interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6), que estão envolvidas na patogênese das doenças inflamatórias (Makarov, 2000; Bharti, Aggarwal, 2002; Oliveira, 2018).

Para isso, a busca por novos fitoterápicos anti-inflamatórios pode ser de grande importância através da utilização de diferentes métodos para a avaliação de tal atividade farmacológica.

2.4 FAMILIA LEGUMINOSAE

A família Leguminosae, também conhecida como Fabaceae possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 650 gêneros e 18.000 espécies (Polhill, 1981; Souza; Lorenzi, 2005). sendo várias de suas espécies com grande potencial econômico, tais como grão-de-bico (*Cicer arietinum*), ervilha (*Pisum sativum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), lentilha (*Lens culvaris*), feijão-mungo (*Vigna radiata*), e a soja (*Glycinemax*), na produção alimentícia; o jatobá (*Hymenaea spp.*) na produção de madeira e o flamboyant (*Delonix regia*) com a utilização ornamental; além das espécies barbatimão (*Styphnodendron adstringens*) e sucupira (*Pterodon ssp.*) com grande importância na medicina (Santana, 2014; Jardine; Barros, 2015).

No Brasil são encontrados cerca de 200 gêneros e 1500 espécies. No bioma Cerrado, constitui a família mais representativa em número, com cerca de 777 espécies, distribuídas em aproximadamente 101 gêneros (Santana, 2014; Jardine; Barros, 2015).

2.5 GÊNERO *Pterodon*

No Brasil, o gênero *Pterodon* compreende quatro espécies nativas: *Pterodon abruptus* Benth, *Pterodon apparicioi* Pedersoli, *Pterodon emarginatus* Vogel, *Pterodon pubescens* Benth e *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Carvalho, 2004), distribuídas por diferentes estados brasileiros, tais como: Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais e São Paulo (Dutra, 2008; Bavaresco, 2016).

Estudos fitoquímicos realizados com espécies do gênero têm identificado substâncias da classe dos alcalóides na casca (Torrenegra *et al.*, 1999); isoflavonas e alguns triterpenos no caule (Marques *et al.*, 1998); além de diterpenos (Fascio *et al.*, 1976; Arriaga *et al.*, 2000) e isoflavonas nos frutos e sementes (Dutra, 2009 a; Santos, 2010).

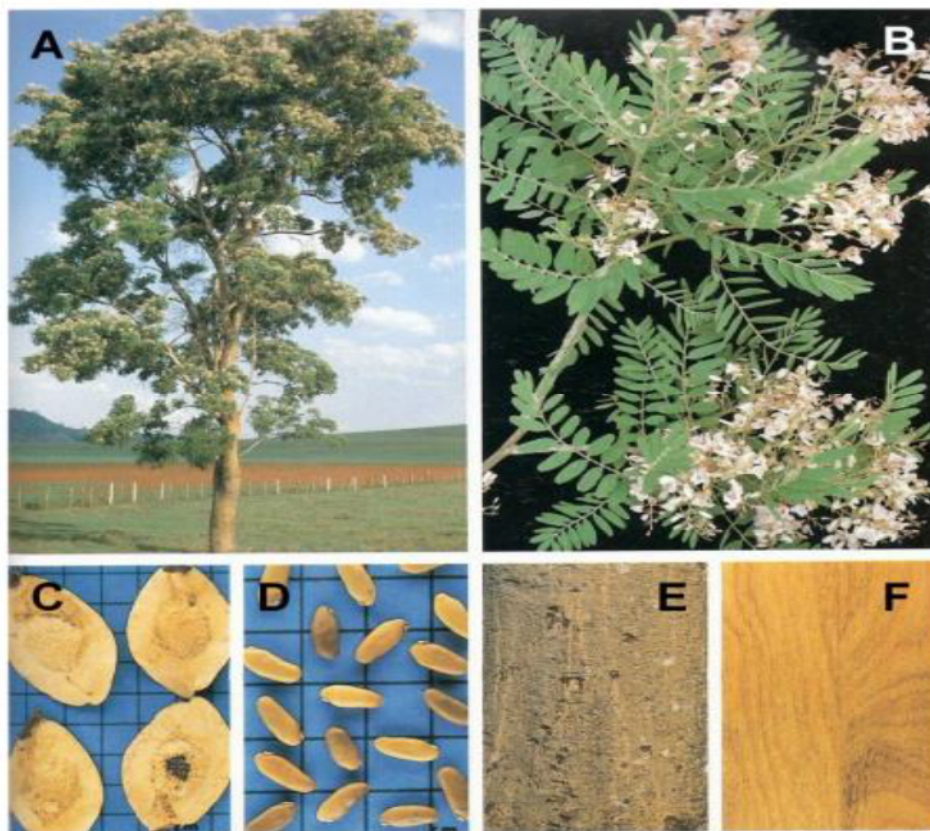
2.6 ESPÉCIE *Pterodon emarginatus* VOGEL

Pterodon emarginatus Vogel é uma espécie vegetal arbórea, rústica e aromática, nativa do cerrado e nas regiões intermediárias entre Mata Atlântica e Cerrado de ampla ocorrência nos estados de Tocantins, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul. A espécie é conhecida popularmente pelo nome de sucupira, “sucupira-branca” ou faveira (Lorenzi, 2010).

Apresenta-se como uma leguminosa de porte médio, árvores de 5 a 10 metros, podendo chegar a 20 metros de altura (figura 4). Possui tronco ereto de 40 a 50 centímetros de diâmetro (Lorenzi, 2010).

Figura 2 - Espécie vegetal arbórea de *Pterodon emarginatus*

A: Árvore, B: Folhas e Flores, C: Frutos, D: Sementes, E: Tronco, F: Madeira



Fonte – Kiatkoski, 2011

Frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel (Figura 3) podem ser colhidos diretamente da árvore ou recolhê-los no chão após a queda. Assim que obtidos, podem ser diretamente utilizados para a sementeira, ou abertos manualmente para a retirada da semente (Dutra, 2008).

A maturação dos frutos ocorre entre junho e agosto (Silva *et al.*, 2005), e os frutos macerados, liberam um óleo fortemente aromático, com sabor característico amargo, que misturado com água pode ser utilizado de várias formas, in natura, infusões alcoólicas, chás e xaropes (Santos *et al.*, 2010; Botini *et al.*, 2015).

Figura 3 - Fruto de *Pterodon emarginatus* cortada ao meio com evidência da estrutura alveolar contendo o óleo característico da espécie.



Fonte: Kiatkoski, 2011.

Estudos comprovaram que os frutos de *P. emarginatus* Vogel (Figura 4) possuem flavonoides, cumarinas, saponinas, triterpenos, esteroides (Hansen *et al.*, 2010).

Em seu fruto é encontrado elementos como o beta-cariofileno, substância química com atividade anti-inflamatória, antibiótica, antioxidante, anticarcinogênico e anestésico local, o que comprova as propriedades medicinais da sucupira (Brandão, 2002; Bavaresco, 2016).

Figura 4- Frutos de Sucupira branca - *Pterodon emarginatus* Vogel



Fonte: Autora

Esta espécie *P. emarginatus* é utilizada na medicina popular contra vários sintomas, sendo que as partes mais utilizadas são a casca e a favinha (fruto) também chamada de semente, como depurativo do sangue, no combate a verminose, secreções vaginais, reumatismo, infecções em geral, dor de garganta, rins, dores de coluna, úlceras estomacais e infecções gastrointestinais. São usadas de várias formas, in natura, infusões alcoólicas, chás e xaropes (Botini *et al.*, 2015).

2.7 CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Pterodon emarginatus* VOGEL

Conhecer a composição química das matérias-primas ativas vegetais, utilizadas na elaboração de medicamentos fitoterápicos, é um passo de extrema importância para que o produto obtido tenha qualidade, segurança e eficácia. É importante considerar que mudanças nas condições climáticas, fatores genéticos e ambientais afetam as vias do metabolismo secundário das espécies vegetais (Khare *et al.*, 2020).

Deste modo, o número de compostos, suas quantidades relativas e o rendimento do extrato de uma mesma espécie vegetal irá variar, significativamente, resultando em diferenças nas propriedades farmacológicas e terapêuticas da planta (Wang *et al.*, 2021).

A presença de diversos compostos químicos nos frutos de *Pterodon emarginatus* confere à essa planta potencial terapêutico e farmacológico. Esses compostos podem ser estudados para entender melhor suas propriedades medicinais e seus possíveis usos na medicina tradicional ou farmacologia moderna (Hansel *et al.*, 2010).

O fruto de sucupira possui endocarpo alado rico em óleo onde foram identificados flavonóides, heterosídeos saponínicos, resinas e traços de esteróides e triterpenóides (Silva *et al.*, 2005; Bustamante *et al.*, 2010).

Constituintes voláteis extraídos dos frutos (Polo *et al.*, 2004) e sementes (Dutra *et al.*, 2009) de *P. emarginatus* apresentam composição química diferenciada, sendo identificados substâncias da classe dos terpenos e terpenoides, tais como: β -elemeno (15,3%), trans-cariofileno (35,9%), α -humuleno (6,8%), germacreno D-(9,8%), biciclo germacreno (5,5%), espatulenol (5,9%) dentre outros como α -pineno, mirceno, metil eugenol, etil eugenol, eugenol geraniol.

Frutos de *P. emarginatus*, amplamente distribuídos no Cerrado brasileiro, têm sido investigados quanto à atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória (Dutra *et al.*, 2009; Alves, 2012; Santos *et al.*, 2018).

Estudo realizado por Alves e colaboradores em 2013, identificou grande polimorfismo químico entre as amostras analisadas dos frutos de *P. emarginatus*, coletados em cinco locais do Cerrado. Neste estudo, os resultados obtidos por Análise de Componentes Principais e Cluster identificou dois grupos: cluster I contendo β -cariofileno e δ -elemeno e cluster II contendo α -copaeno, β -cubebeno, alo-aromadendreno, α -cubebeno e γ -muuruleno, mostrando a necessidade da realização de novos estudos da composição química desta espécie vegetal.

3 JUSTIFICATIVA

Até o momento, não há relatos na literatura de estudos relacionando à composição química aos efeitos biológicos de quatro quimiotipos de *P. emarginatus*. Assim, a investigação sobre os efeitos antimicrobiano, antioxidante e anti-inflamatório, de extratos oleaginosos obtidos dos frutos de *P. emarginatus*, possibilitará determinar quais são os marcadores químicos marjoritários dos diferentes quimiotipos e relacioná-los com as atividades citadas.

4. HIPÓTESE

Extratos oleaginosos obtidos a partir dos frutos de *P. emarginatus* são fonte promissoras em apresentar propriedades antibacterianas, antioxidantes e anti-inflamatórias.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição química e as atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória de extratos oleaginosos de frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel (sucupira branca) coletadas em quatro regiões brasileiras.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os extratos oleaginosos dos quatro quimiotipos coletados;
- Analisar a composição química de frutos e extratos oleaginosos obtidos dos frutos dos quatro quimiotipos de *P. emarginatus*, utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de *P. emarginatus* sobre bactérias patogênicas.
- Determinar a atividade antioxidante dos extratos oleaginosos de *P. emarginatus* a partir do método DPPH•.
- Investigar a viabilidade celular da linhagem monocítica THP-1 diferenciada em macrófagos frente aos extratos de *P. emarginatus*.
- Quantificar a dosagem da citocina IL-1 β a fim de investigar o potencial anti-inflamatório dos extratos de *P. emarginatus*.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Os frutos de quatro quimiotipos foram coletados dos municípios de Altinópolis/SP (21°03'20,65"S; 47°29'10,8"W), Araxá/MG (19°36'37,1"S; 47°08'18,5"W), Inocência/MS (19°48'06,5"S; 51°59'07,8"W) e Rifaina/SP (20°4'33,1"S; 47°25'27"W) de *Pterodon emarginatus* Vogel, Brasil. Após a coleta, os frutos foram armazenados, em recipientes de vidro, com tampa, e sob refrigeração (-18 °C). A permissão para realizar o estudo químico e avaliar as bioatividades de extratos de plantas brasileiras foi concedida pelo o Sistema Nacional de Gestão de Recursos Genéticos e Tradicionais Associados Conhecimento (SisGen - nº A6324D6).

6.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO OLEAGINOSO

Para a obtenção do extrato oleaginoso, pesou-se, separadamente, 30g dos frutos de diferentes quimiotipos de *P. emarginatus* Vogel, e adicionou-se a cada frasco contendo os frutos, 270 mL de etanol 92 °GL. Após maceração, durante sete dias, o material foi filtrado e o solvente evaporado, em capela de exaustão. Os frascos contendo os extratos oleaginosos foram pesados, vedados e mantidos sob refrigeração, até o momento das análises químicas e biológicas. As extrações foram realizadas em triplicata.

Os extratos oleaginosos obtidos foram:

1 *P. emarginatus* coletado em Altinópolis/SP, $m_{\text{total}} = 3,69\text{g}$ ($m_{\text{média}} = 1,23 \pm 0,03\text{g}$)

2 *P. emarginatus* coletado em Rifaina/SP, $m_{\text{total}} = 4,52\text{g}$ ($m_{\text{média}} = 1,51 \pm 0,03\text{g}$)

3 *P. emarginatus* coletado em Araxá/MG, $m_{\text{total}} = 4,46\text{g}$ ($m_{\text{média}} = 1,49 \pm 0,09\text{g}$)

4 *P. emarginatus* coletado em Inocência/MS, $m_{\text{total}} = 6,84\text{g}$ ($m_{\text{média}} = 2,28 \pm 0,06\text{g}$)

6.3 ANÁLISE DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS DOS FRUTOS DE *Pterodon emarginatus* POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS - GC-MS

Foram realizadas extrações dos constituintes químicos voláteis dos frutos de *P. emarginatus*, através da microextração em fase sólida em modo headspace (HS-SPME), utilizando fibra "SPME" (PDMS/DVB).

Para tanto, frutos de *P. emarginatus* foram adicionadas em frascos de headspace (HS) com capacidade de 20 mL, lacrados com lacre de alumínio e septo de borracha. As amostras foram submetidas a 30 minutos de extração, na temperatura de 60 °C.

Posteriormente, a fibra SPME foi introduzida no modo HS para adsorção dos analitos e em seguida exposta à fase gasosa. Após o tempo de extração, foi inserida no injetor do cromatógrafo a 240 °C, por 5 min para a dessorção dos constituintes químicos voláteis extraídos. A identificação das substâncias foi efetuada através da comparação dos seus espectros de massas com o banco de dados do sistema GC-MS (NIST 62 lib.) e índice de retenção de Kovats (Adams, 2007).

As análises foram realizadas na Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP.

As análises dos constituintes químicos voláteis dos extratos oleaginosos obtidos dos frutos de *P. emarginatus* foram realizadas por GC-MS, utilizando-se aparelho Varian 3900 com detector seletivo de massa, modelo Saturn 2100T. As condições de análise foram: coluna capilar: DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm); temperatura do injetor: 260 °C; temperatura do detector: 270 °C; impacto de elétrons: 70 eV; gás de arraste: He; fluxo: 1,0 mL/min.; split: 1/20; programa de temperatura: 100 °C (4°C/min) – 270 °C, 5min., volume de injeção: 1 µL de solução (1 mL extrato oleaginoso/1 mL CHCl₃) (Hoscheid *et al.*, 2012).

6.4 BACTÉRIAS DO ESTUDO

6.4.1 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

O potencial antimicrobiano dos extratos oleaginosos obtidos foi avaliado frente a diferentes espécies bacterianas pertencentes à coleção do Prof. Dr. André Pitondo da Silva, situado no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular da UNAERP. As bactérias estudadas estavam criopreservadas a -80 °C em criotubos contendo meio de cultura líquido BHI (brain heart infusion) acrescido de glicerol 15 %.

Foram testadas linhagens bacterianas de diferentes espécies da *American Type Culture Collection* (ATCC) que fazem parte do grupo denominado ESKAPE, acrônimo que compreende os nomes científicos dos seis patógenos bacterianos altamente virulentos e resistentes a antibióticos mais frequentes nas infecções hospitalares e comunitárias, incluindo:

Enterococcus faecium, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (Esposito; Simone, 2017).

Também uma linhagem bacteriana clínica, isolada de paciente com infecção hospitalar a qual apresenta o perfil de resistência aos antimicrobianos denominado como *Pandrug-resistant* (PDR), por apresentar não susceptibilidade a todos os antimicrobianos testados (42 antimicrobianos diferentes) (Cerdeira *et al.*, 2021).

As linhagens bacterianas que foram testadas são: *Enterococcus faecalis* ATCC 4083, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Acinetobacter baumannii* ATCC 14293, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, e a linhagem clínica PDR *Klebsiella pneumoniae* Kp177 (Cerdeira *et al.*, 2021).

Tabela 1- Descrição das bactérias testadas

Bactéria	Atuação	Classificação
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 4083	Microbiota normal do sistema digestivo humano e de outros mamíferos. Pode causar infecção urinária, meningite e bacteremia, especialmente em ambientes hospitalares.	Gram-positiva
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Pode provocar doenças, que vão desde uma simples infecção até infecções graves.	Gram-positiva
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Encapsulada, anaeróbia facultativa em forma de bastonete. É o mais importante membro do género <i>Klebsiella</i> e importante membro da família das enterobactérias.	Gram-negativa
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 14293	Pertence ao filo Proteobacteria. Não móveis, as espécies de <i>Acinetobacter</i> são oxidase-negativas, e se apresentam em pares.	Gram-negativa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Baciliforme e aeróbia. Ambiente de origem é o solo, mas é capaz de viver mesmo em ambientes hostis. Se desenvolve com facilidade em ambientes úmidos, mesmo com carência nutricional.	Gram-negativa
<i>Enterobacter</i> spp. ATCC 13047	Família <i>Enterobacteriaceae</i> , bactérias pequenas, anaeróbias facultativas (realizam metabolismo respiratório ou fermentativo). Ocorrem a nível de quase toda a Natureza, algumas são agentes patogénicos oportunistas, causam várias infecções e podem também provocar septicemia e meningite.	Gram-negativa
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PDR Kp177	Linhagem bacteriana clínica, isolada de paciente com infecção hospitalar a qual apresenta o perfil de resistência aos antimicrobianos denominado como <i>Pandrug-resistant</i> (PDR).	Gram-negativa

Fonte: a autora

6.4.2 Cultivo dos Microrganismos e Preparo do Inóculo

As bactérias crioconservadas, antes de sua utilização, passaram pelo processo de reativação. Para isso, 10 µL do estoque bacteriano foram pipetados em tubos de ensaio contendo 4,5 mL do meio de cultura líquido BHI (Oxoid, Reino Unido) e incubado por 24 horas a 37 °C. Essa etapa se faz importante para que a bactéria se reproduza mantendo todas suas características genéticas, saindo do ambiente de estresse. Após as 24 horas, com auxílio de uma alça descartável e estéril, 10 µL da cultura foram inoculados em placas de Petri contendo Agar Müller Hinton (Oxoid, Reino Unido), pelo método de semeadura por esgotamento e as placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C.

Com as colônias crescidas, isoladas e puras, prosseguiu-se para o preparo do inóculo que foi utilizado na avaliação da concentração inibitória mínima. Foram feitas suspensões bacterianas em solução salina esterilizada, visando obter uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹). Dessa suspensão inicial, 500 µL foram pipetados e transferidos para um tubo de ensaio contendo 4,5 mL de solução salina também esterilizada, realizando uma diluição, obtendo o inóculo padronizado para o teste (5×10^7 UFC mL⁻¹).

6.4.3 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima

Para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM), foi utilizado o método de microdiluição em placas de 96 poços, segundo a preconização do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016), com adaptações, empregando-se a resazurina como revelador do crescimento bacteriano, segundo descrito por Pitondo-Silva *et al.* (2016).

Na placa de 96 poços de fundo chato, a primeira coluna serviu como controle negativo, adicionando apenas 100 µL do meio de cultura líquido Müller-Hinton (Oxoid, Reino Unido), a fim de verificar a esterilidade do meio de cultura.

A coluna 12 serviu como controle positivo, adicionando 90 µL do mesmo meio de cultura, acrescidos de 10 µL da suspensão bacteriana padronizada, totalizando um volume de 100 µL, para avaliar a viabilidade do crescimento bacteriano.

Da segunda até a décima primeira coluna, foram adicionados 90 µL do mesmo meio de cultura. Na coluna 2, foram adicionados também 90 µL dos quatro óleos testados (Altinópolis, Rifaina, Araxá e Matogrosso do Sul), em triplicatas, e foram realizadas diluições

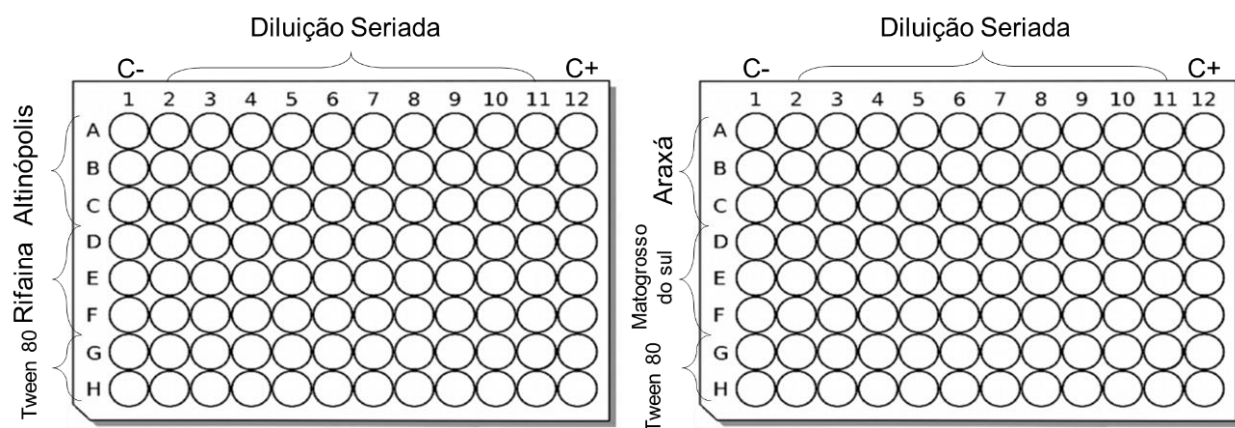
seriadas no fator 2, de forma que as suas concentrações iniciais foram reduzidas à metade, pela passagem da solução de uma coluna para a outra.

Foram testadas duas concentrações dos extratos oleaginosos dos frutos de *P. emarginatus*, uma solução de 200 $\mu\text{g/mL}$ e uma solução de 10 mg/mL . Na primeira testagem a faixa de concentração testada foi de 0,195 a 100 $\mu\text{g/mL}$, já na segunda uma faixa de 9,8 a 5000 $\mu\text{g/mL}$.

Também foi testado o tensoativo Tween 80, na concentração de 4 %, que foi utilizado nos extratos para a mistura com meio de cultura. A concentração inicial foi de 200 $\mu\text{g/mL}$.

Em seguida, foram acrescentados 10 μL do inóculo, sendo que, ao final do experimento, todos os poços da placa ficaram com o volume final de 100 μL . Um modelo das placas pode ser visto na Figura 6. As placas foram então incubadas de 18 a 24 horas em estufa bacteriológica a 37 °C.

Figura 5 – Esquema das placas do teste de CIM



Fonte: Autora

Após a incubação foram realizadas duas leituras qualitativas visuais: uma sem a utilização de indicadores cromogênicos, observando-se apenas a turvação ou não do meio de cultura, indicando a presença ou ausência de crescimento bacteriano, respectivamente. A outra leitura foi realizada utilizando-se o revelador cromogênico resazurina. A solução de resazurina tem cor original azul devido à reação redox, que indica a ausência de crescimento bacteriano e, na forma reduzida apresenta a cor rosa ou roxa, indicando que ocorreu o crescimento bacteriano.

Após a realização da primeira leitura, foram aplicados 30 μL do revelador resazurina (0,02 %) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) em todos os poços da placa. Em seguida, as placas foram levadas para estufa, nas mesmas condições, durante duas horas. Após a incubação, as placas foram visualmente analisadas, para avaliar a presença de crescimento bacteriano pela cor rosa ou roxa ou ausência do crescimento, pela cor azul.

As leituras em triplicatas foram então comparadas, e a CIM foi determinada para a concentração equivalente ao poço com a menor concentração do produto que não permitiu o crescimento bacteriano.

Seguindo o mesmo procedimento, as bactérias testadas foram avaliadas quanto a susceptibilidade ao antimicrobiano, vancomicina. Esse teste foi realizado a fim de confirmar a susceptibilidade das bactérias e comparar os resultados obtidos com as soluções oleosas de *P. emarginatus*. Para isso foi preparada uma solução de vancomicina com concentração igual a 512 $\mu\text{g/mL}$. No primeiro poço da diluição seriada foi acrescido 90 μL desta solução em 90 μL de meio, avaliando a faixa de concentração de 0,5 a 256 $\mu\text{g/mL}$. As bactérias foram consideradas resistentes (não susceptíveis) quando apresentaram CIM igual ou maior a 32 $\mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2016).

6.5 ENSAIO ANTIOXIDANTE *IN VITRO*: DPPH• DOS EXTRATOS OLEAGINOSOS DE *P. emarginatus*

Os extratos oleaginosos obtidos a partir dos frutos de *P. emarginatus* foram avaliados frente à sua capacidade de sequestro do radical estável DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazila). A análise da atividade antioxidante seguiu metodologia proposta por Cheng *et al.* (2006), com adaptações.

Para isso, foi preparada, em metanol, uma solução de 2,2- difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) 0,004 % (p/v) e soluções dos extratos oleaginosos nas concentrações 50; 25; 12,5; 6,25; 5; 2,50; 1,25 mg/mL.

O teste foi realizado em triplicata utilizando 50 μL da solução do extrato acrescida de 950 μL da solução de DPPH incubadas por 30 minutos a 30 °C na ausência de luz. Em seguida, foram lidas as absorvâncias das soluções em espectrofotômetro em comprimento de onda de 517 nm.

Para o controle positivo foi utilizado o padrão rutina em concentrações entre 3,6 e 125 µg/mL (50 µL da solução de rutina + 950 µL DPPH). As porcentagens das taxas de inibição das concentrações foram calculadas utilizando os valores obtidos das absorbâncias das amostras, da solução branco (50 µL metanol + 950 µL DPPH) e do DPPH (1000 µL). A porcentagem de inibição do extrato foi medida por meio da fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{[(\text{Abs do branco} - \text{Abs da amostra}) \times 100]}{\text{Absorbância do DPPH}}$$

A concentração inibitória (IC₅₀) refere-se à mínima concentração de antioxidante necessária para inibir uma determinada concentração de radical em 50 %. Através de gráfico de dispersão obtido a partir dos valores das concentrações da amostra no eixo das abscissas e a porcentagem de inibição no eixo das ordenadas, foi determinada a equação da reta e essa, utilizada para o cálculo da IC₅₀ através (Kirschweng *et al.*, 2017)

6.6 PREPARO *IN VITRO* DA CULTURA CELULAR DA LINHAGEM MONOCÍTICA HUMANA THP-1

A cultura da linhagem celular monocítica humana THP-1 (ATCC ® TIB-202) foi cultivada em meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM; CORNING) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; CORNING), 100 unidades/mL penicilina (GIBCO – THERMO FISHER), 100 µg/mL estreptomicina (GIBCO – THERMO FISHER), foram mantidas incubadas em ambiente estufa à 37 °C e 5% CO₂ por 30 dias, com trocas regulares dos meios de cultura.

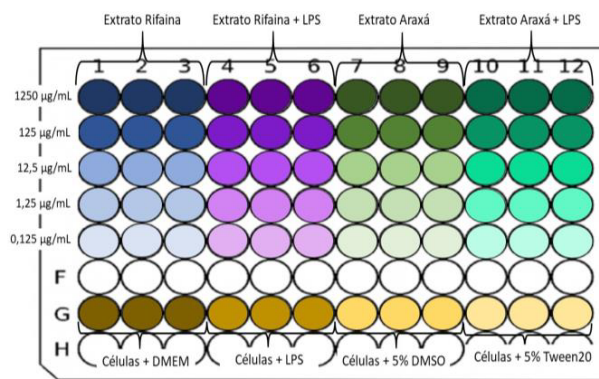
6.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

A viabilidade celular dos extratos foi avaliada através do ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (n=3). Para isso, a linhagem celular monocítica humana THP-1 (ATCC® TIB-202) cultivada por 30 dias, foi retirada da estufa. Foi realizada uma contagem de células por meio de câmara de Neubauer, sendo aceitável uma viabilidade superior a 80%. A concentração de células por poço foi de 1x10⁵ em uma solução do meio DMEM na ausência de soro.

O ensaio foi realizado utilizando uma placa de 96 poços, foram adicionados 100 μ L da solução de células em cada poço. Foi acrescido, também, 100 μ L de uma solução contendo phorbol 12-myristate-13acetate (PMA, SIGMA), para diferenciar a linhagem monocítica THP-1 em macrófagos e fixa-los na placa e em seguida a placa foi incubada em estufa à 37 °C e 5% CO₂.

Após 24 horas de incubação, foi retirado o sobrenadante de todos os poços e foram adicionados 100 μ L dos extratos oleaginosos dos frutos de *P. emarginatus* dos quimiotipos Rifaina e Araxá nas concentrações 2500; 250; 25; 2,5 e 0,25 μ g/mL. Após 2 horas de incubação foram adicionados 100 μ L do meio DMEM em determinados poços com os extratos e 100 μ L de solução de Lipopolissacarídeos (LPS) (MARCA) a 1 μ g/mL em outros poços contendo os extratos. Assim as concentrações dos extratos caíram para 1250; 125; 12,5; 1,25 e 0,125 μ g/mL. Também foram preparados quatro grupos de controles: Células com LPS, células com meio DMEM, células com veículo (meio DEMEN + Tween 20 1%) e Células mais DMSO a 5%, conforme Figura 9. Essas placas foram reincubadas nas mesmas por 24 horas.

Figura 6 – Esquema da placa de 96 poços para ensaio de viabilidade celular.



Fonte: a autora

Após esse período, foi retirado o sobrenadante de todos os poços, este foi transferido para outra placa para posteriores avaliações. Nos poços foram adicionados 100 μ L de solução de MTT a 0,5 mg/mL para cada poço, a fim de verificar a viabilidade celular. Após adição do MTT a placa foi incubada por 3 horas em estufa à 37 °C e 5% CO₂. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e foram adicionados 100 μ L de DMSO (Dimetilsulfóxido) para inativar a atividade dos macrófagos e parar as reações. A placa ficou 5 minutos em agitação suave para estabilização da cor e posteriormente foi colocada no espectrofotômetro de microplacas μ Quant (BioTek Instruments INC.) e realizada a leitura em 540 nm.

Seguidamente, os valores de absorvância foram colocados em tabelas no excel e foi realizada a conta da viabilidade celular seguindo a seguinte fórmula:

$$Viabilidade (\%) = \frac{(absorbância\ da\ amostra - absorbância\ do\ branco) * 100}{(absorbância\ do\ controle\ negativo - absorbância\ do\ branco)}$$

6.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

A partir do sobrenadante do ensaio de viabilidade celular foi dosado a concentração da citocina IL-1 β usando os KITS ELISA seguindo as instruções do fabricante BD Pharmacy[®]. O teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é uma técnica molecular utilizada para detectar e quantificar a interação entre antígenos e anticorpos (Aydin, 2015).

Foi preparada uma solução de tampão de lavagem Phosphate Buffered Saline (PBS) com 0,05 % de Tween 20. Para tanto pesou-se 80 g de NaCl, 11,6 g de Na₂HPO₄, 2g de KH₂PO₄, 2 g de KCl, q. s. p. 10 L de água destilada com pH final ajustado para 7,0.

Na placa com o sobrenadante foi adicionado 100 μ L por poço do anticorpo de captura (BD optEIA[™] Set Human IL-1 β) e a placa foi incubada *overnight* por 4 °C. Retirou-se o excesso da placa e lavou-se com tampão de lavagem três vezes, deixando agir por 30 segundos cada vez. Foi adicionado 200 μ L por poço de um diluente de ensaio (PBS suplementado com 10 % de Phetal Bovine Serum, pH 7,0) e a placa foi incubada por uma hora em temperatura ambiente.

Retirou-se o excesso de solução da placa e lavou-se com o tampão de lavagem por três vezes. Foram adicionados 100 μ L da amostra nos poços da placa. A placa foi selada e incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Retirou-se a solução e lavou-se novamente nas mesmas condições. Foram adicionados, então, 100 μ L por poço do anticorpo de detecção (BD optEIA[™] Set Human IL-1 β) e a placa foi selada e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se 100 μ L por poço da enzima SAV-HPR (BD optEIA[™] Set Human IL-1 β). A placa foi selada e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente (22 °C). Foi realizada mais três lavagens com tampão de lavagem e por fim uma lavagem com PBS por um minuto de contato, retirando o excesso no final.

Adicionou-se 100 μ L por poço da solução de substrato e a placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente na ausência de luz. Logo depois, foram adicionados 50 μ L

de ácido sulfúrico 2 N, com a finalidade de parar a reação. Em seguida, foi realizada a leitura da placa em 450 nm no espectrofotômetro de microplacas μ Quant (BioTek Instruments INC.)

6.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Após a obtenção de todos os resultados, foram realizadas análises estatísticas para comparação dos extratos oleaginosos dos frutos de *P. emarginatus*. As análises e gráficos foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 9.0.0 (121), outubro 22, 2020.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 ANÁLISE DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS DOS FRUTOS DE *Pterodon emarginatus* POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS - CG-EM

Os constituintes voláteis dos frutos de *P. emarginatus*, extraídos por HS-SPME estão compilados na Tabela 2. Observou-se diferença no perfil químico dos constituintes voláteis coletados em Rifaina/SP, Araxá/MG, Altinópolis/SP e Inocência/MS; sendo trans-cariofileno o constituinte majoritário dos frutos coletados em Rifaina/SP (33,70 %), Araxá/MG (22,60 %) e Inocência/MS (18,98 %). Também foi possível observar que o terpeno β -elemene está presente em maior concentração (11,20 %) nos frutos coletados em Araxá/MG; enquanto o terpeno α -himachalene foi detectado com 21,50 % nos frutos coletados em Rifaina/SP e 11,80 % nos frutos coletados na cidade de Inocência/MS.

Os cromatogramas e espectros de massas obtidos nas análises por HS-SPME-CG-EM estão presentes nos Apêndices de 1 à 5.

O perfil químico das espécies coletadas em 4 locais diferentes está relacionado a diversos fatores como local de crescimento da planta, época em que as sementes foram coletadas, posicionamento geográfico, luminosidade, temperatura ambiente e nível pluviométrico. Tais fatores podem ter efeitos críticos tanto na quantidade quanto na qualidade dos extratos oleaginosos obtidos.

Tabela 2- Análise dos constituintes voláteis dos frutos de *Pterodon emarginatus* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, HS-SPME-GC-MS.

Constituintes Orgânicos Voláteis (VOCs)	Rifaina/SP	Altinópolis/SP	Araxá/MG	Inocência/MS
Cubebene	1,60 %	-	2,04 %	-
β -elemene	3,80 %	1,40 %	11,20 %	2,03 %
Trans-caryophyllene	33,70 %	1,22 %	22,60 %	18,98 %
Caryophyllene -4,8-epoxy-	2,00 %	1,72%	-	-
Iridolactone -trans, cis	1,82 %	2,91 %	9,36 %	1,50 %
α -himachalene	21,50 %	-	-	11,80 %
Longipiranol	6,00 %	1,10 %	-	5,55 %
Viridiflorol	3,00 %	-	-	2,70 %
Caryophylla-4(12),8(13) dien-5(α)-ol	- 1,40 %	-	-	-
Selina-3,11-dien-6- α -ol	2,10 %	1,31 %	-	1,70 %

Continuação Tabela 2. Análise dos constituintes voláteis dos frutos de *Pterodon emarginatus* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, HS-SPME-GC-MS.

Constituintes	Orgânicos	Rifaina/SP	Altinópolis/SP	Araxá/MG	Inocência/MS
Voláteis (VOCs)					
Cedr-8(15) em-9-α-ol		2,84 %	1,24 %	-	2,36 %
Hexadecanol <n->		1,00 %	7,50 %	-	1,91 %
β-selinene		-	1,66 %	-	-
α-selinene		-	2,42%	-	-
Spathulenol		-	1,51 %	-	-
Aromadendrene epoxide <allo->		-	1,00 %	1,08 %	-
Selin-11-em-4-α-ol		-	1,61 %	-	-
Tetradecanol <n->		-	1,44 %	-	-
Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-α-ol		-	1,68%	-	-
Eudesma-4(15),7-dien-1-β-ol		-	1,27 %	-	-
Amorfa-4,9-dien-2-ol		-	1,66 %	-	-
Farnesyl acetate <(2E,6E)>		-	3,00 %	-	-
Isopimera-9(11),15-diene 3,11		-	5,69 %	-	-
δ-elemene		-	-	4,54 %	1,05 %
Longicyclene		-	-	1,25 %	-
β-copaene		-	-	1,72 %	-
α-guaiene		-	-	1,90 %	-
α-neo-clovene		-	-	2,01 %	-
γ-muurolene		-	-	14,03 %	-
Muurola-4(14),5-diene <trans->		-	-	7,14 %	-
Trans-β-guaiene		-	-	1,68 %	-
δ-amorphene		-	-	3,20 %	-
Spathulenol		-	-	1,10 %	-
Abienol		-	-		6,80 %

Fonte: a autora

Após comparação dos espectros de massas obtidos após análise por CG-EM, dos extratos oleaginosos dos frutos de *P. emarginatus* e comparação com dados da literatura (Adams, 2007; Hoscheid *et al.*, 2012), foi possível identificar os diterpenoides geranilgeraniol e 14,15-epoxy-geranilgeraniol, além do diterpeno vouacapano 6 α -hidroxi-7 β -acetoxivouacapan-17 β -oato de metila (APÊNDICES 6 a 12).

Estudos químicos e biológicos realizados com espécies do gênero *Pterodon*, incluindo a espécie *P. emarginatus* têm sugerido que as propriedades farmacológicas de extratos dos frutos estejam envolvidas com a presença destes constituintes (Oliveira *et al.*, 2017).

Tal fato chama-nos a atenção quando observamos os perfis cromatográficos dos extratos oleaginosos, obtidos por CG-EM, verificando-se que os frutos coletados em Rifaina (SP) e Araxá (MG) são fontes promissoras destes constituintes.

7.2 CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS OLEAGINOSOS de *P. emarginatus* PARA A AVALIAÇÃO DO CIM

A avaliação da concentração inibidora mínima foi efetuada através de diluições seriadas em duas diferentes concentrações dos extratos oleaginosos conforme tabela 3.

Tabela 3- Concentrações de extratos oleaginosos utilizadas nas placas de poço para avaliação do CIM

Concentração 200 µg/mL	Concentração 10 mg/mL
Poço 1: Controle Negativo 100 uL de meio de cultura Mueller Hinton	Poço 1: Controle Negativo 100 uL de meio de cultura Mueller Hinton
Poço 2: Concentração 100 µg/mL	Poço 2: Concentração 5000 µg/mL
Poço 3: Concentração 50 µg/mL	Poço 3: Concentração 2500 µg/mL
Poço 4: Concentração 25 µg/mL	Poço 4: Concentração 1250 µg/mL
Poço 5: Concentração 12,5 µg/mL	Poço 5: Concentração 625 µg/mL
Poço 6: Concentração 6,25 µg/mL	Poço 6: Concentração 312,5 µg/mL
Poço 7: Concentração 3,125 µg/mL	Poço 7: Concentração 156,25 µg/mL
Poço 8: Concentração 1,56 µg/mL	Poço 8: Concentração 78,125 µg/mL
Poço 9: Concentração 0,78 µg/mL	Poço 9: Concentração 39 µg/mL
Poço 10: Concentração 0,39 µg/mL	Poço 10: Concentração 19,5 µg/mL
Poço 11: Concentração 0,195 µg/mL	Poço 11: Concentração 9,8 µg/mL
Poço 12: Controle Positivo 90 µL de meio de cultura Mueller Hinton + 10 µL suspensão bacteriana.	Poço 12: Controle Positivo 90 µL de meio de cultura Mueller Hinton + 10 µL suspensão bacteriana.

Fonte: a autora

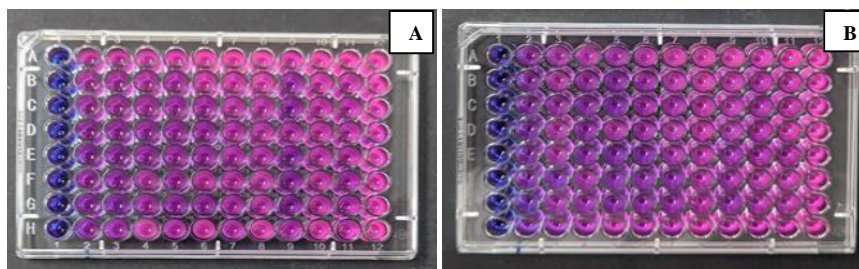
7.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA NAS PLACAS DE TESTES DA CIM

Os ensaios de atividade antibacteriana com os extratos oleaginosos de sucupira e suas diluições, nas condições avaliadas, não apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias estudadas. Para a avaliação do CIM foram utilizadas em diluições seriadas duas concentrações dos extratos oleaginosos, concentração 200 $\mu\text{g/mL}$ e concentração 10 mg/mL .

Não foi evidenciado inibição no crescimento com as cepas microbianas, estudadas após as duas leituras qualitativas realizadas visualmente. Sendo a primeira sem a utilização de indicadores cromogênicos, onde foi observado apenas a ausência de turvação do meio de cultura, indicando o crescimento bacteriano.

A segunda leitura foi realizada após utilização do revelador cromogênico Resazurina 0,02%. Esta solução tem cor original azul devido à reação redox, que indica a ausência de crescimento bacteriano e, na forma reduzida apresenta a cor rosa ou roxa, indicando que ocorreu o crescimento bacteriano (Figura 10).

Figura 7 - Placas com semeadura de *Klebsiella pneumoniae* PDR com leitura pela resazurina.



Fonte: a autora

A: Extratos oleaginosos de Rifaina e Altinópolis; B: Extratos oleaginosos de Inocência e Araxá

Estudos, realizados com a espécie *P. emarginatus* nos últimos 50 anos, mostram evidências de atividade antimicrobiana na faixa de 40 μL do óleo essencial e 80 μL do extrato hidroalcoólico. Nas condições do ensaio, o óleo essencial foi capaz de inibir o crescimento do agente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por disco difusão (Mendes *et al.*, 2017).

No estudo realizado em difusão em ágar, a investigação da atividade antimicrobiana do óleo essencial obtido a partir de sementes da espécie *P. emarginatus*, nas concentrações de 0,5 à 100%, mostrou que nenhuma das concentrações ensaiadas apresentou atividade

antibacteriana, frente ao microrganismo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Ferreira *et al.*, 2014).

Quando buscamos trabalhos com o gênero *Pterodon*, foi possível encontrar relato da atividade antibacteriana do extrato hexânico das sementes de *P. pubescens*. Santos *et al.* (2023) relatam a atividade antibacteriana, determinada a partir do método de diluição em caldo em placas de 96 poços, dos extratos frente a três linhagens bacterianas com CIM na faixa de 25 à 500 µg/mL, para as linhagens *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Prevotella nigrescens*.

7.4 ENSAIO DE SUSCEPTIBILIDADE PARA O ANTIMICROBIANO VANCOMICINA

No ensaio de susceptibilidade para vancomicina (Figura 8), somente a bactéria *Klebsiella pneumoniae* PDR foi classificada como não susceptível, sendo inibida a partir da concentração de 256 µg/mL.

Figura 8 – Concentração inibitória mínima para Vancomicina



Fonte: a autora

As demais bactérias foram classificadas como sensíveis por não serem resistentes a 32 µg/mL ou mais, todas as concentrações podem ser visualizadas na tabela 4. Esses resultados corroboram com a viabilidade da metodologia empregada, obtendo-se resultados esperados e validando as análises realizadas.

Tabela 4 - Concentração inibitória mínima para vancomicina

Concentração inibitória mínima para vancomicina	
Linhagens bacterianas	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Entreobacter cloacae</i> ATCC 13047	2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	2
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 14293	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	4
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6569	0,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PDR	256

Fonte: a autora

7.5 ENSAIO ANTIOXIDANTE POR REDUÇÃO DO RADICAL DPPH•

A IC_{50} representa a metade da concentração inibitória máxima que a substância possui para reduzir em 50 % a ação oxidante do DPPH•.

As análises demonstraram que a atividade antioxidante da rutina foi determinada em IC_{50} 11,5 $\mu\text{g/mL}$, tendo sido ensaiadas concentrações entre 125 e 3,6 $\mu\text{g/mL}$.

Quanto à ação antioxidante dos extratos de *P. emarginatus* de localidades distintas, pode ser observada na Tabela 5. A média das porcentagens de inibição dos testes, realizados em triplicata, respectivos às concentrações dos extratos oleaginosos de *P. emarginatus*, bem como do controle positivo rutina.

Tabela 5 - Resultados da atividade antioxidante dos extratos oleaginosos de *P. emarginatus*, expressa pela porcentagem de sequestro de radicais DPPH•

Amostra	IC₅₀
<i>P. emarginatus</i> – Altinópolis/SP	10.960,0 \pm 0,85 $\mu\text{g/mL}$
<i>P. emarginatus</i> – Araxá/MG	17.260,0 \pm 0,77 $\mu\text{g/mL}$
<i>P. emarginatus</i> – Rifaina/SP	10.390,0 \pm 0,67 $\mu\text{g/mL}$
<i>P. emarginatus</i> – Inocência/MS	49.250,0 \pm 0,24 $\mu\text{g/mL}$
Rutina	11,49 \pm 0,31 $\mu\text{g/mL}$

Fonte: a autora

Os extratos oleaginosos dos frutos de *P. emarginatus* apresentaram capacidade antioxidante. Sendo o extrato de Rifaina/SP o que apresentou maior poder antioxidante dentre os quatro extratos avaliados. Sua atividade foi 4,7 vezes superior à atividade apresentada pelo

extrato da localidade Inocência/MS e 0,7 vezes superior à atividade apresentada pelo extrato da localidade Araxá/MG. Donati e colaboradores (2022) apresentaram valor de IC₅₀ da ordem de 6,25 – 8,65 mg/mL com extratos oleaginosos obtidos das sementes de *P. emarginatus*.

7.6 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E CITOTOXICIDADE

Os extratos oleaginosos dos frutos de *P. emarginatus* das localidades de Rifaina e Araxá nas concentrações de 1250 e 125 µg/mL mostraram ser tóxicas para as células, nessas concentrações quase não houve viabilidade celular. A viabilidade foi mantida na concentração de 0,125 µg/mL no tratamento sem LPS (Tabela 6), não tendo valor diferente estatisticamente significativo (valor de $p \leq 0,05$) na análise de one-way ANOVA (APÊNDICES 13 e 14). Já para o extrato de Araxá o tratamento nas concentrações de 12,5 e 1,25 µg/mL também não apresentou diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle (Figuras 9 e 10).

Tabela 6 – Média das viabilidades celular pós-tratamento com os extratos.

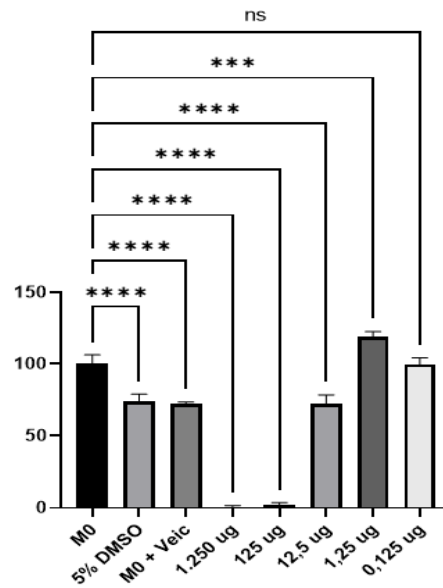
Amostra	Células + DMEM	Viabilidade Celular pós-tratamento com os Extratos (%)						
		Células + 5% DMSO	Células + 5% Tween 20	1250 µg/mL	125 µg/mL	12,5 µg/mL	1,25 µg/mL	0,125 µg/mL
Rifaina	100 ± 5,01 %	73,71 ± 4,27 %	72,45 ± 0,84 %	0,72 ± 0,84 %	1,90 ± 1,55 %	72,17 ± 2,18 %	118,97 ± 2,72 %	99,55 ± 3,74 %
Araxá	100 ± 5,01 %	73,71 ± 4,27 %	72,45 ± 0,84 %	0,45 ± 0,78 %	2,62 ± 1,34 %	84,82 ± 11,47 %	84,82 ± 7,75 %	94,49 ± 24,05 %

Fonte: a autora

O ensaio de MTT é comumente utilizado como ferramenta em experimentos *in vitro* para avaliação da citotoxicidade e viabilidade celular após o tratamento de células monociticas para macrófagos.

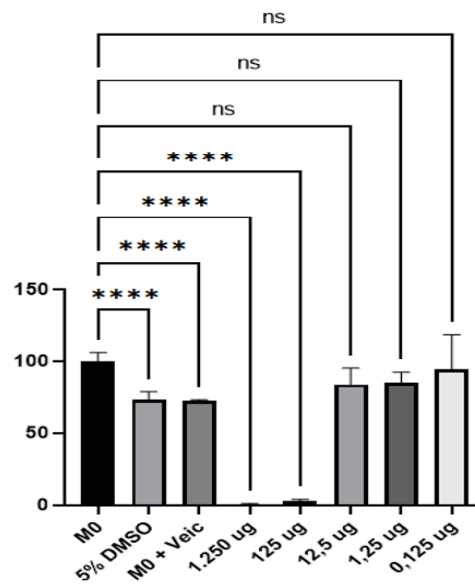
Diversos ensaios de citotoxicidade, como Trypan Blue e LDH, determinam apenas o dano estrutural celular, ao passo que o ensaio de viabilidade por MTT avalia o dano funcional da célula através da sua atividade mitocondrial. Os gráficos 9 e 10 demonstram a viabilidade celular das células expostas aos extratos oleaginosos de *P. emarginatus*.

Figura 9 – Gráfico estatístico da viabilidade com tratamento do extrato de Rifaina/SP



Fonte: a autora

Figura 10 - Gráfico estatístico da viabilidade Foode com tratamento do extrato de Araxá/MG



Fonte: a autora

Tabela 7 – Média das viabilidades celular pós-tratamento com os extratos de *P. emarginatus* + LPS.

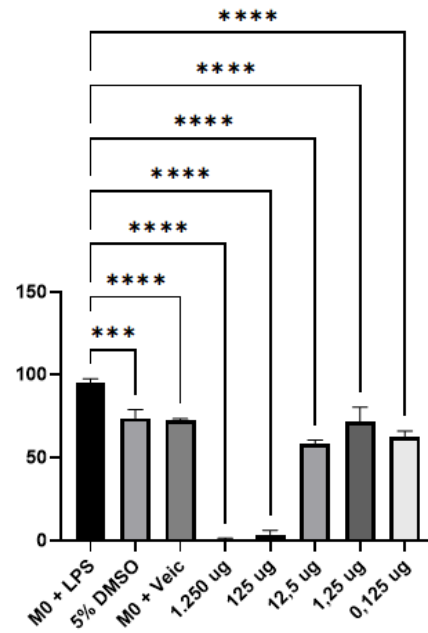
Amostra	Viabilidade Celular pós-tratamento com os Extratos + LPS (%)							
	Células + DMEM	Células + 5% DMSO	Células + 5% Tween 20	1250 µg/mL	125 µg/mL	12,5 µg/mL	1,25 µg/mL	0,125 µg/mL
Rifaina	100 ± 2,30	73,71 ± 4,27	72,45 ± 0,84	0,85 ± 0,75	3,60 ± 2,70	58,35 ± 2,33	71,72 ± 8,64	62,52 ± 3,48
Araxá	101 ± 2,30	73,71 ± 4,27	72,45 ± 0,84	0,76 ± 0,72	2,85 ± 0,85	74,19 ± 13,27	74,76 ± 9,14	98,20 ± 10,53

Fonte: a autora

Para os tratamentos com LPS, apenas a concentração de 0,125 µg/mL para o extrato de Araxá mostrou ser estatisticamente semelhante ao controle de LPS, as demais concentrações de ambos extratos diminuíram a viabilidade celular, quando comparadas ao controle (Tabela 7). A concentração de 0,125 µg/mL do extrato de Rifaina mostrou ser estatisticamente semelhante com os tratamentos na concentração de 12,5 e 1,25 µg/mL. Entretanto, para o extrato de Araxá, somente as concentrações de tratamento de 12,5 e 1,25 µg/mL apresentaram uma semelhança estatística em manter a viabilidade.

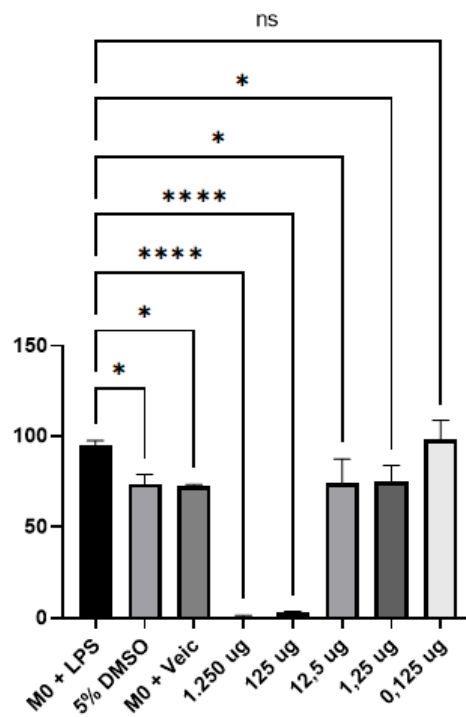
Ambos os controles, DMSO e veículo (Tween 20 a 5%), demonstraram ser estatisticamente diferentes do controle com LPS, tendo uma viabilidade menor, demonstrando que o veículo utilizado tem efeitos na diminuição da viabilidade celular, porém esse efeito é agravado no tratamento com os extratos nas duas maiores concentrações para ambos extratos (Figuras 11 e 12).

Figura 11 - Gráfico estatístico da viabilidade com tratamento do extrato de Rifaina + LPS



Fonte: a autora

Figura 12 - Gráfico estatístico da viabilidade com tratamento do extrato de Araxá + LPS



Fonte: a autora

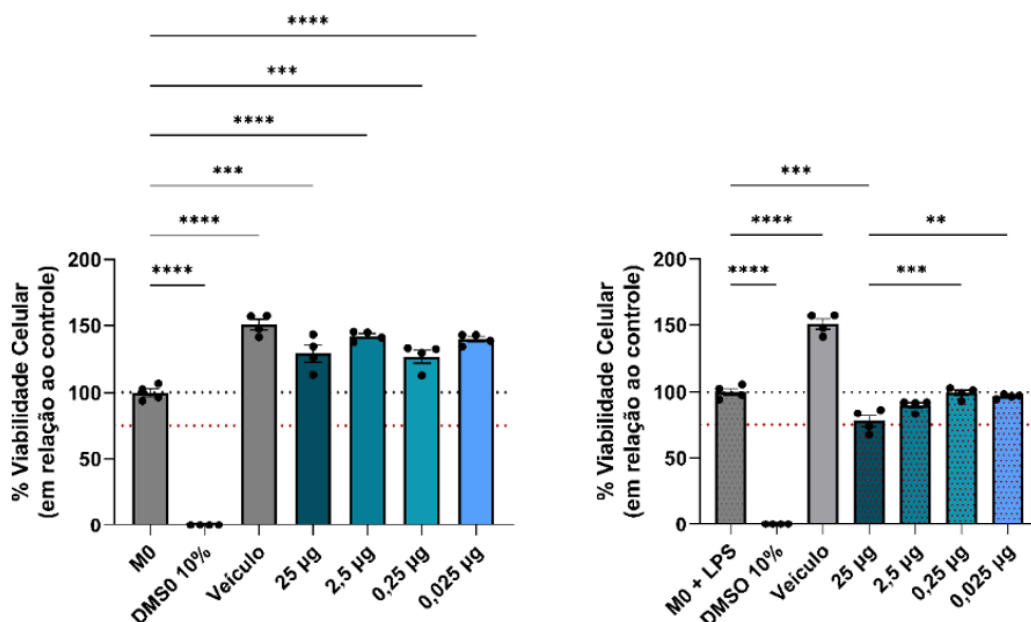
A concentração de melhor viabilidade celular foi de 0,125 $\mu\text{g/mL}$, nessa concentração todos os tratamentos mantiveram similariedade estatística com os controles, exceto o tratamento do extrato 2 (Rifaina/SP) + LPS, demonstrando que esse extrato teve toxicidade celular, porém ainda manteve a viabilidade acima de 60 %.

A viabilidade celular de extratos de *P. emarginatus* é pouco estudada, fazendo-se necessários novos estudos para compreender os efeitos dessa planta a nível celular.

Para a espécie *Pterodon pubescens*, há um relato da viabilidade celular, do extrato dos frutos, frente outra linhagem celular (HaCat – queratinócito humano) em um intervalo de 0,5 a 50 $\mu\text{g/mL}$, cuja viabilidade não foi reduzida significativamente quando comparado ao controle celular com 100% de viabilidade (Basting *et al.*, 2020).

Na tentativa de diminuir a faixa de concentrações ensaiadas para determinar a viabilidade celular, das células THP-1, frente ao extrato da localidade Rifaina (Figura 13).

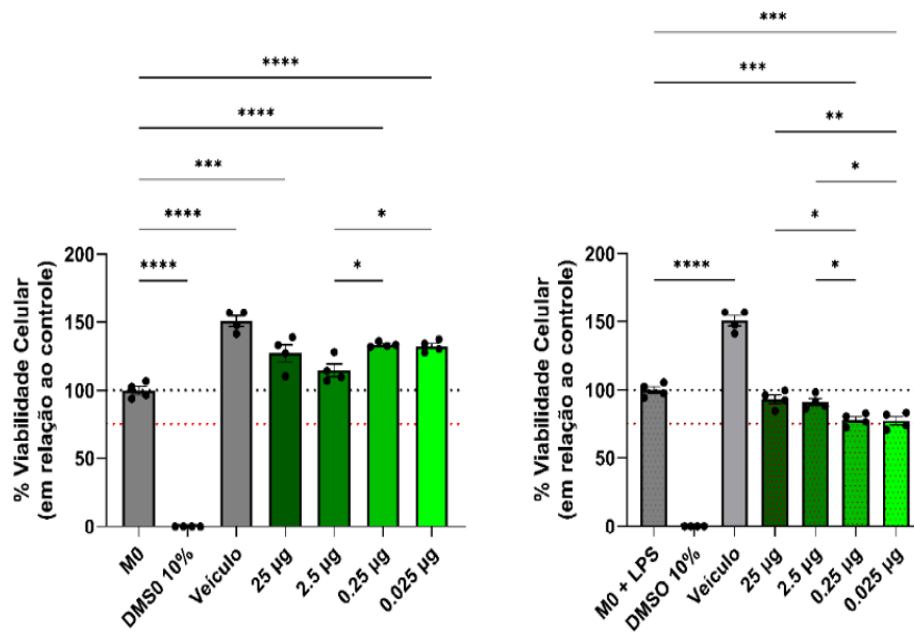
Figura 13 - Gráficos estatísticos da viabilidade das células THP-1 expostas aos extratos de *Pterodon emarginatus* de Rifaina – SP.



Fonte: a autora

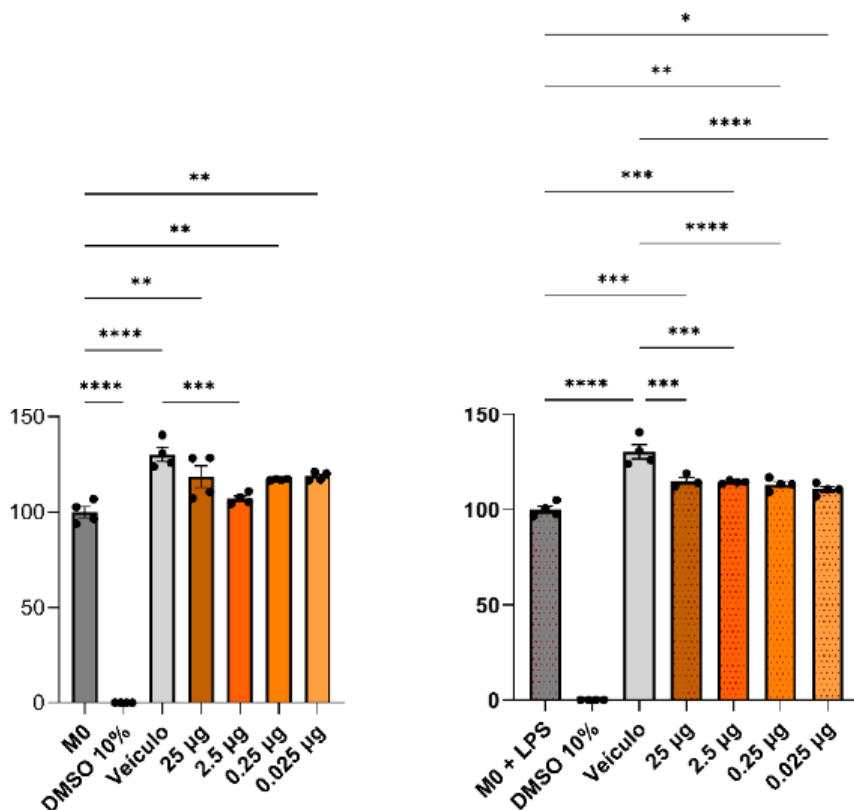
Os resultados dos ensaios da viabilidade celular, frente aos extratos dos indivíduos coletados em Altinópolis (Figura 14) e Inocência (Figura 15), podem ser observados a seguir.

Figura 14 - Gráficos estatísticos da viabilidade das células THP-1 expostas aos extratos de *Pterodon emarginatus* de Altinópolis – SP.



Fonte: a autora

Figura 15 - Gráficos estatísticos da viabilidade das células THP-1 expostas aos extratos de *Pterodon emarginatus* de Inocência – MS.



Fonte: a autora

Dentre os trinta e um trabalhos publicados na base PUBMED de 1973 à 2023, não há ensaios de viabilidade celular *in vitro*, que possam ser comparados aos resultados obtidos neste trabalho.

7.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

As dosagens de IL-1 β foram avaliadas pelo valor de absorbância gerado pelo espectrofotômetro de microplacas (Tabela 8).

Foi observado que os extratos estimularam a produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β . Isso ocorreu principalmente nas concentrações 1250, 125, 1,25 e 0,125 $\mu\text{g/mL}$ para ambos os extratos (Tabela 8).

Os macrófagos, quando expostos a agentes agonistas de receptores *Toll Like* (TLR), incluindo o lipopolissacarídeo (LPS), iniciam o processo de síntese da interleucina 1 β (Dinarello, 2005). Uma vez que a IL-1 β madura é exclusivamente sintetizada a partir do complexo de proteínas denominadas “inflamassoma de IL-1 β ”, podemos afirmar, a partir de nossas quantificações que a via ativa da inflamação é necessariamente a do inflamassoma.

Tabela 8 – Média das leituras de absorvância pós-tratamento extratos + LPS.

Absorvância de IL-1β pós-tratamento com Extratos + LPS						
Amostra	Concentração do extrato ($\mu\text{g/mL}$)					
	Controle	1250	125	12,5	1,25	0,125
Rifaina	0,35 \pm 0,12	1,56 \pm 0,13	2,69 \pm 0,05	0,28 \pm 0,005	2,22 \pm 0,09	1,52 \pm 0,11
Araxá	0,35 \pm 0,12	1,69 \pm 0,31	2,55 \pm 0,36	0,39 \pm 0,06	2,11 \pm 0,17	2,46 \pm 0,05

Fonte: a autora

Os resultados para IL-1 β , mostraram que os extratos oleaginosos dos frutos de *P. emarginatus* das localidades de Rifaina/SP e Araxá/MG apresentam um potencial pró-inflamatório em algumas concentrações estudadas.

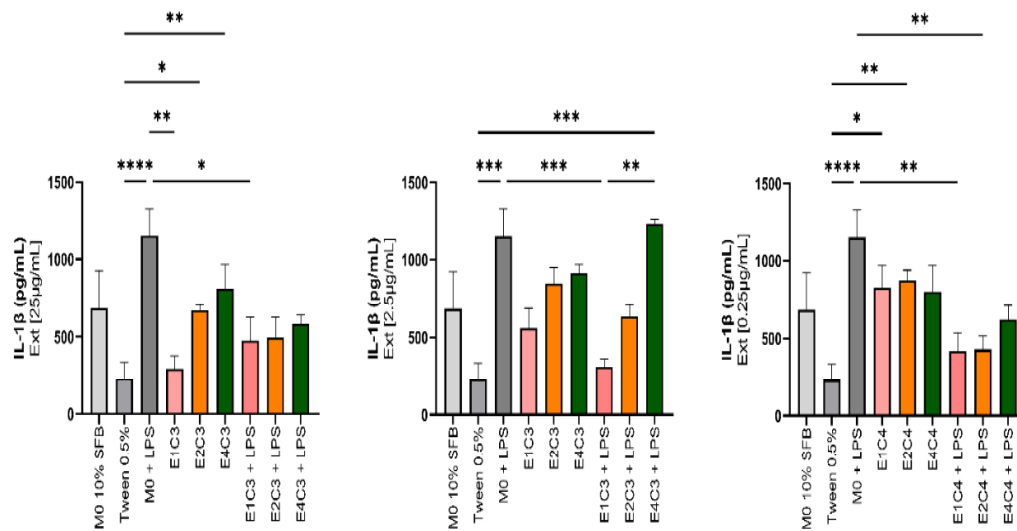
Em células TPH-1, a atividade pró-inflamatória observada (Figura 16) pode estar relacionada a morte por estresse oxidativo uma vez que durante o momento em que as células estavam vivas, elas foram capazes de produzir uma quantidade elevada da citocina inflamatória (IL-1 β).

Durante os processos inflamatórios são produzidas as EROS que tem um papel importante na sinalização de mediadores inflamatórios. Quando os mecanismos antioxidantes celulares são incapazes de neutralizar a produção excessiva das EROS, sinalizadores intracelulares amplificam as respostas inflamatórias, estabelecendo assim uma cascata de eventos inflamatórios adversos (Barboza, 2016).

Em estudos etnofarmacológicos, a espécie *P. emarginatus* é amplamente utilizada contra infecções microbianas e processos inflamatórios. Todavia dos 31 trabalhos publicados na base PUBMED de 1973 à 2023, não há ensaios de viabilidade celular *in vitro*, tão pouco, ensaio antimicrobianos que tenham sido executados para determinação da concentração inibitória mínima, que possam ser comparados aos resultados obtidos neste trabalho.

O efeito anti-inflamatório relatado na literatura sempre foi demonstrado em modelos animais, sendo este trabalho o primeiro a investigar a atividade anti-inflamatória *in vitro*, do extrato oleaginoso de acessos da espécie *P. emarginatus*, em célula THP-1.

Figura 16 - Gráfico estatístico da expressão da interleucina 1 β por células THP-1, submetidas aos extratos E1 (Altinópolis-SP); E2 (Rifaina-SP) e E3 (Araxá-MG), expostas ou não ao polilipossacarídeo (LPS)



Fonte: a autora

8 CONCLUSÕES

Os extratos oleaginosos obtidos dos quatro quimiotipos foram caracterizados quimicamente.

Os resultados mostraram que os extratos oleaginosos obtidos das sementes de *Pterodon emarginatus* não apresentaram atividade antibacteriana frente as cepas avaliadas (ESKAPE).

Os dados obtidos neste trabalho sugerem que os extratos oleaginosos de *P. emarginatus*, apresentam potencial antioxidante, podendo conter substâncias capazes de doar elétrons e assim reduzir radicais livres como observado no teste com o DPPH.

A viabilidade e citotoxicidade celular da linhagem monocítica foi comprovada, nas condições do ensaio.

Em células TPH-1, a atividade pró-inflamatória observada, pode estar relacionada a morte por estresse oxidativo, uma vez que a produção da citocina IL-1 β é exclusivamente sintetizada via inflamassoma. Estudos de quantificação do nitrito (NO), ânion superóxido e até mesmo outros métodos de análise antioxidante do extrato poderão ser, futuramente, realizados para que se confirme este mecanismo de ação.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, concluímos que embora a tintura de *P. emarginatus* seja popularmente utilizada como antimicrobiano e anti-inflamatório, é possível que, a ação terapêutica relatada, não esteja relacionada diretamente com o efeito bactericida dos compostos presentes na tintura. Mas, a superestimulação das células locais que estão em contato com a(s) bactéria(s), que será fagocitada, ao entrar em contato com o extrato ou tintura oleaginosa da sucupira desencadeam a produção de citocinas pró-inflamatórias que, por sua vez, geram espécies reativas de oxigênio (EROS). O acúmulo de EROS no microambiente celular levará as bactérias fagocitadas a morte.

Estudos futuros, que comprovem ou refutem essa hipótese trarão uma contribuição relevante à comunidade científica.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**, (4th ed.), Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007.
- ALVES, S. F. **Estudo da composição química de atividades biológicas e microencapsulação do óleo essencial dos frutos de *Pterodrum emarginatus* Vogel (Fabaceae) – “Sucupira”**. In: *Faculdade de Farmácia*. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.
- ALVES, S. F. *et al.* Chemical variability of the essential oils from fruits of *Pterodrum emarginatus* in the brazilian cerrado. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 23 (2), 2013.
- ASSUNÇÃO, L.A.; LEMES, S.R.; ARAËJO, L.A.; COSTA, C.R.; MAGALHÃES, L.G.; MOURA, K.K.; MELO-REIS, P.R. Assessment of the cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic activities of sucupira oil (*Pterodon emarginatus*). **Genetics And Molecular Research**, [S.L.], v. 14, n. 2, p. 6323-6329, 2015. Genetics and Molecular Research. <http://dx.doi.org/10.4238/2015.june.11.7>.
- AYDIN, S. Uma breve história, princípios e tipos de ELISA, e nossa experiência laboratorial com análises de peptídeos/proteínas usando ELISA. *Peptídeos*, 2015.
- BARBOZA, Joice Nascimento. **Uma visão geral sobre o potencial anti-inflamatório e perfil antioxidante do eugenol**. João Pessoa, 2018. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/15560/1/JNB08112018.pdf>. Acesso em Junho de 2023.
- BASTING, R. T.; SOUSA, I. M. O.; BUTTERWECK, V.; FOGGIO, M. A. Antiproliferative Effects of *Pterodon pubescens* Extract and Isolated Diterpenes in HaCaT Cells. **Planta Medica**, [S.L.], v. 87, n. 03, p. 218-224, 3 nov. 2020. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/a-1279-0645>.
- BASTOS, G. M.; NOGUEIRA, N. A. P.; SOARES, C. L.; MARTINS, M. R.; ROCHA, L. Q.; TEIXEIRA, A. B. *In vitro* determination of the antimicrobial potential of homemade 42 preparations based on medicinal plants used to treat infectious diseases. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32, n.1, p.113-120, 2011.
- BAVARESCO, O. C. A. *et al.*, Utilização popular da *Pterodon* spp no tratamento de doenças reumáticas. **Rev. Investig. Bioméd.** São Luís 8:81-91. 2016.
- BHARTI, A. C.; AGGARWAL, B. B. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochemical Pharmacology*, v.64, p.883-888, 2002.
- BOCHNIE, K. A.; GREGÓRIO, P. C.; MACIEL, R. A. P. Análise da viabilidade celular por mtt em células tratadas com toxinas urêmicas – revisão. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 1, n. 15, 14 mar. 2017.
- BORGES, L. P., AMORIM, V. A. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS, **Revista Agrotecnologia**, Ipameri, v.11, n.1, p.54-67, 2020.
- BOTINI, N.; ANTONIAZZI, C.A.; SOUZA, K.A.; AÑEZ, R.B.; Estudo etnobotânico das espécies *Bowdichia virgilioides* e *Pterodon pubescens* na comunidade salobra grande município de porto estrela, MT. **Biodiversidade**, V.14, N2, 2015.

BRANDÃO, M. J. P.; LACABUENDIA, J. F.; MACEDO, A. Árvores nativas e exóticas do Estado de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, 23 (217): 264- 265, 2002.

BRASIL, Ministério da Saude, **Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos, 2014.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da Atividade Antioxidante dos Compostos Fenólicos Naturalmente Presentes em Subprodutos do Pseudofruto de Caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia Alimentos**, Campinas, v.27, n.4, p. 902-908, out./dez., 2007.

BUSTAMANTE, K.G.L. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) - Fabaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** [online]. 2010,

CARDINAL, S. *et al.* Anti-inflammatory properties of quebecol and its derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.26, p. 440-444, 2016.

CERDEIRA, L. *et al.* Draft genome sequences of PDR and XDR *Klebsiella pneumoniae* belonging to high-risk CG258 isolated from a Brazilian tertiary hospital. **Infect Genet Evol.**, v. 87:104643, 2021.

CHANDRA, H *et al.* Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobial – a review. **Plants**, v.6, n.16, p.1-11, 2017.

CHENG, Z.; MOORE, J.; YU, L. High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI M100-S26. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2016.

COLLINS, C.H. BRAGA; G.L. BONATO; PIERINA, S. Fundamentos de Cromatografia. Editora Unicamp Campinas, SP. 2006

CRUZ, Carlos Eduardo Cardoso da Silva. **Avaliação da expressão post-mortem das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 em cérebro de Mus musculus submetidos à dor**. Dissertação (mestrado) – Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, 2019. Disponível em: <http://educapes.capes.gov.br/handle/capes/621837>. Acesso em junho de 2023.

DE VEL, E.V. SAMPERS, I.; RAES, K. A Review on Influencing Factors on the Minimum Inhibitory Concentration of Essential Oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.59, n. 3, p.357-378, 2019.

DINARELLO, C.A. **Blocking IL-1 in systemic inflammation**. USA. Journal of Experimental Medicine, 2005.

DRESCH, R. R.; CARVALHO, J. G. Analysis of Phytotherapy Programs and Live Pharmacies in the Unified Health System – SUS. **Revista Fitos**, v. 15, supl. 1, p. 22-34, 2022.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil, Construindo a História de produtos naturais, **Rev. Muti Ciências**, 2006.

DUTRA, R. C. **Avaliações fitoquímica e farmacológica das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel**/Rafael Cypriano Dutra; orientador: Profa. Nádia Rezende Barbosa. – 244 f. il. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2008.

DUTRA, R.C. *et al.* Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2A, p.35-429, 2009.

EKIERT, H. *et al.* A Significance of *Artemisia vulgaris* L. (Common Mugwort) in the History of Medicine and Its Possible Contemporary Applications Substantiated by Phytochemical and Pharmacological Studies. **Molecules**, v.25, n.19, p.4415, 2020.

ESPOSITO S.; SIMONE.G. Update on the main MDR pathogens: prevalence and treatment options. **Infez Med**, v. 25, n. 4, p. 301- 310. 2017.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I. dos; SIMÕES, C. M. O. Introdução à Análise Fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 2ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 2000.

FARHADIA, N. *et al.* Changes in essential oil compositions, total phenol, flavonoids and antioxidant capacity of *Achillea millefolium* at different growth stages. **Industrial Crops & Products** v. 152, 112570, 2020.

FASCIO, M. *et al.* Diterpenoid furans from *Pterodon* species. **Phytochemistry**, v,15, p. 201-203, 1976.

FERREIRA, M. G. R. Aspectos sociais da fitoterapia. Porto Velho/RO: EMBRAPA Rondônia (Documentos 102), 2006.

FERREIRA, S. B.; DANTAS, I. C.; CATÃO, R. M. M.; . Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vogel) **Rev. bras. plantas med.** 16 (2) • Jun 2014.

GARCIA, A. A.; CARRIL, E. P. U. **Metabolismo secundario de plantas**. Reduca (biología), v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GARZON, L. R. *et al.* Complexos triazenidos de platina (II): Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana e citotóxica frente a bactérias e células de medula óssea de pacientes leucêmicos de um hospital escola. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.36, n.2, p.285-291, 2015.

GONÇALVES, J. H. T.; SANTOS, A. S.; MORAIS, H. A. Atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e triagem fitoquímica de ervas condimentares desidratadas. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 13, n. 1, p. 486-497, 2015.

GONZAGA, D.V.B.; VIEIRA, F.O. Interleucina – 1: Revisão de literatura das funções biológicas dos membros da família IL-1. **Acervo da Iniciação Científica** 2013. Disponível em: <https://www.metodista.br/revistas/revistas-izabela/index.php/aic/article/view/401/363> Acesso em: 24/02/2024

HANSEN, D.; HARAGUCHI, M.; ALONSO, A. Pharmaceutical properties of sucupira' (*Pterodon* spp.) **Braz. J. Pharm. Sci.** 46 (4), Dec 2010.

- HE, X. *et al.* Correlation between Chemical Composition and Antifungal Activity of *Clausena lansium* Essential Oil against *Candida* spp. **Molecules**, v. 24, p. 1394, 2019.
- HOSCHEID, J. *et al.* Determination by GC–MS–SIM of furanoditerpenes in *Pterodon pubescens* Benth.: development and validation. **Talanta**, v. 100, p. 372-376, 2012.
- HOSTETTMAN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003.
- HUNG, L. *et al.* Human ex vivo and *in vitro* disease models to study food allergy. *Asia Pacific Allergy*. v.9, n.1, p. 1-13, 2019.
- JARDINE, J. G.; BARROS, T. D. *Árvore do conhecimento, agroenergia. Soja. EMBRAPA*, 2015. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/> Acesso em 25 de agosto de 2023.
- KANY, S.; VOLLRATH, J. T.; RELJA, B. Cytokines in inflammatory disease. **Int. J. Mol. Sci.** v.20, p. 1-31, 2019.
- KHARE, S. *et al.* Plant secondary metabolites synthesis and their regulations under biotic and abiotic constraints. **Journal of Plant Biology**, v. 63, p. 203–216, 2020.
- KIATKOSKI, E. C. **Estudo fitoquímico dos frutos e sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel E *Pterodon polygalaeiflorus* Benth**, Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, 2011.
- KIRSCHWENG, B. *et al.* Natural antioxidants as stabilizers for polymers. **Polymer Degradation and Stability**, v. 145, 2017.
- LA ROCA, *et al.* Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Rev. Bras. Farm.**, 88(4): 177-180, 2007.
- LINDE GÁS LTDA. **Cromatografia gasosa**. Disponível em:. Acesso em: 09 de abril de 2016.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2ed. Nova Odessa, SP: Plantarum, vol. 1, p. 227, 2010.
- MACHADO *et al.* Atividade anti-micobacteriana de *Baccharis dracunculifolia*, *Centella asiatica*, *Lantana camara* e *Pterodon emarginatus*, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2017.
- MACHADO, E.; MENDES, V.; SANT'ANNA, J.; OLIVEIRA, S. C. C.; MALDONADE, I. Inhibitory effects of *Pterodon emarginatus* bean oil and extract on *Staphylococcus aureus*. **Pharmacognosy Research**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 348, 2017. EManuscript Technologies. http://dx.doi.org/10.4103/pr.pr_13_17.
- MAKAROV, S. NF-KB as therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. **Molecular Medicine Today**, v.6, p.441-448, 2000.
- MARQUES, D.D. *et al.* Isoflavonoids and triterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeiflorus*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.9, n.3, p.295-301, 1998.

- MILLEZI, A.F. *et al.* Caracterização química e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Rev Bras de Plantas Medicinai**s, v.16, n.1, p.18-24, 2014.
- MORESCO, K.S. **Efeitos terapêuticos de *Achyrocline satureioides* (Lam.) : estudos *in vivo* e *in vitro***. 2017. 100 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.
- MUNN, L. L. Cancer and inflammation. *WIREs Syst Biol Med*. v.9, n.2, e.1370, 2016.
- NASCIMENTO, Y. M. Estudo fitoquímico e atividade antioxidante de *Zornia brasiliensis*. 2016. 114 pág. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) — Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.
- NEVES *et al.* Teste de suscetibilidade de dermatófitos ao extrato semi sintético hexanólico de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Anais eletrônicos da XV Semana Científica Farmacêutica**, Goiânia: UFG, 2007.
- NIERO, R. *et al.* Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. (Org.). **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**. Itajaí: UNIVALI, 2003.
- OLIVEIRA, L. A. R.; OLIVEIRA, G.A.R.; BORGES, L.L.; BARA, M.T.F. SILVEIRA D. Vouacapane diterpenoids isolated from *Pterodon* and their biological activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 2017 v. 27, 663-672p.
- OLIVEIRA, L. A. R. **Avaliação *in vitro* das atividades antimicrobiana e anti-inflamatória de vouacapanos de *Pterodon emarginatus* vogel (FABACEAE)** Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas, 2018.
- PAULA, F. B.; GOUVÊA, C. M.; ALFREDO, P. P.; SALGADO, L. Protective action of a hexane crude extract of *Pterodon emarginatus* fruits against oxidative and nitrosative stress induced by acute exercise in rats. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1, 17 ago. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-5-17>.
- PEREIRA, A. M. S. *et al.* **Formulário Fitoterápico da Farmácia da Natureza**. São Paulo: Bertolucci, 2ªed, p. 406, 2014.
- PITONDO-SILVA A., GONÇALVES G. B., STEHLING E. G. Heavy metal resistance and virulence profile in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Brazilian soils. **Apmis**, v.124, n.8, p. 681-8, 2016.
- POLHILL, R. M., RAVEN, P. H., ATIRTON, C. H. Evolution and systematics of the Leguminosae. In: POLHILL, R. M., RAVEN, P. H. (ed.) **Advances in Legume Systematics**. Kew, UK:Royal Botanic Gardens, 1981.
- POLO, *et al.* Caracterização fitoquímica do extrato bruto hexânico e do óleo essencial dos frutos da espécie *Pterodon emarginatus* Vog. **Revista da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas**, v. 26, p.45-49, 2004.

- RASKIN, I. *et al.* Plants and Human Health in the Twenty-First Century. **Trends Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522-531, 2002.
- REDÍGOLO, M.M.; COSTA, I.; VEGA, O. **Cadernos de ciência da conservação** Volume 1. Tintas brasileiras”. Ed. Scortecci. 1ª Ed. 2020.
- ROCHA, F.D.; KAPLAN, M. A. C. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE SUCUPIRA BRANCA (*Pterodon emarginatus*). **Ciências Exatas e da Terra**, Química 4. Química de Produtos Naturais, 2006.
- ROGERO *et al.* Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. **Toxicology in Vitro**, 2000.
- ROSA, W. **Bioprospecção em espécies vegetais da família Fabaceae, da mata atlântica mineira, visando a obtenção de substâncias com potencial anti-inflamatório**, Alfenas, MG, 208 f.: il. – Tese Dissertação Doutorado, 2021.
- SANTANA, A. R. **Transferibilidade e desenvolvimento de sistema multiplex de genotipagem de marcadores microssatélites para *Pterodon emarginatus* Vogel (FABACEAE)**, 1-61 f. Universidade Federal de Goiás, 2014.
- SANTOS, G. B. *et al.* Oil from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog: A traditional anti-inflammatory. Study combining in vivo and in silico. **J Ethnopharmacol.**, v. 222, p.107-120, 2018.
- SANTOS, J. G.; FERNANDES, C. C.; SILVA, N. B. S.; CALEFI, G. G.; MARTINS, C. H. G.; VOLPINI, G. A.; CROTTI, A. E. M.; RIBEIRO, A. B.; ESPERANDIM, T. R.; TAVARES, D. C. Volatile compounds of hexane extract from *Pterodon pubescens* Benth seeds and its significant in vitro potential against different bacterial strains. **Natural Product Research**, [S.L.], p. 1-6, 24 dez. 2023. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2023.2297405>.
- SANTOS, L. M, SIPERT, C. R. Viabilidade celular por MTT para padronização da concentração de soro bovino fetal em células de papila apical in vitro. **Brazilian Oral Research**. São Paulo, 2021.
- SANTOS, U.; RAMOS, C. O.; SANCHES, N. M.; SOUSA, F. F. Propriedade antibacteriana dos frutos de Sucupira branca (*Pterodon pubescens*). **Revista Eletrônica de Biologia**, v. 3, n. 4, 2010.
- SHI, D. *et al.* In vitro and ex vivo systems at the forefront of infection modeling and drug discovery. **Biomaterials**. v.198, p. 228-249, 2019.
- SILVA, I.D. *et al.* Efeito do extrato de sucupira (*Pterodon emarginatus* vog.) sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 35 (2): 109-115, 2005 – 109. 2005.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; **Princípios de Análise Instrumental**, 5ª ed., Bookman: Porto Alegre, 2002.
- SOARES *et al.* F. Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante da Casca de Uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 1, p. 059-064, Março, 2008.

SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos como Antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v 15, n.1, p.71-81, jan./abr., 2002.

SOLEZ *et al.* Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). **Am J Transplant**. 2007.

STODDART M.J. Cell viability assays: introduction. **Methods in molecular biology** Clifton, N.J, 2011.

TORRENEGRA *et al.* Type alkaloids from bowdichia virgiloides. **Phytochemistry**. 1999.

VASCONCELOS, T. B. *et al.* Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? UNOPAR, **Cient Ciênc Biol Saúde**,2014.

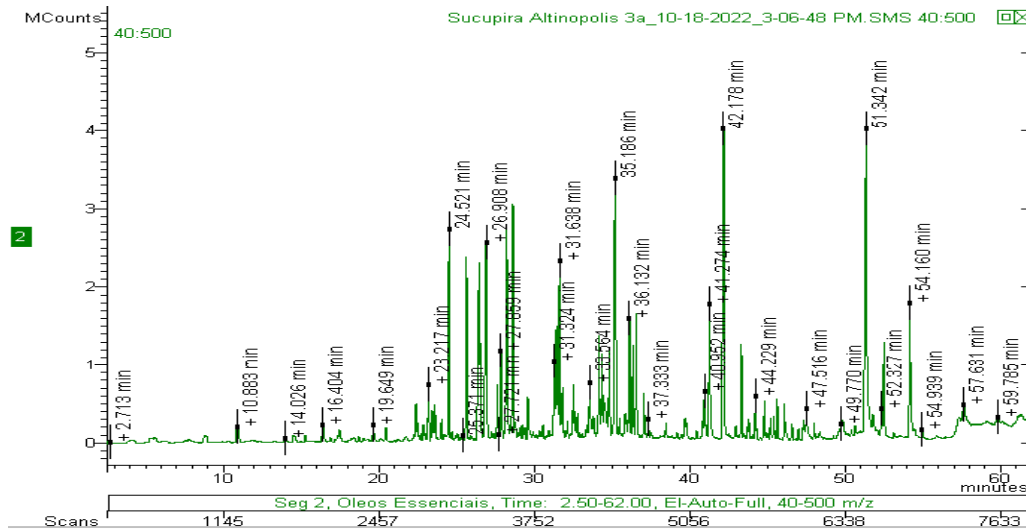
VEIGA JR, V.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, Vol. 28, No. 3, 519-528, 2005.

WANG, M. A novel approach for lavender essential oil authentication and quality assessment. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 199:114050, 2021.

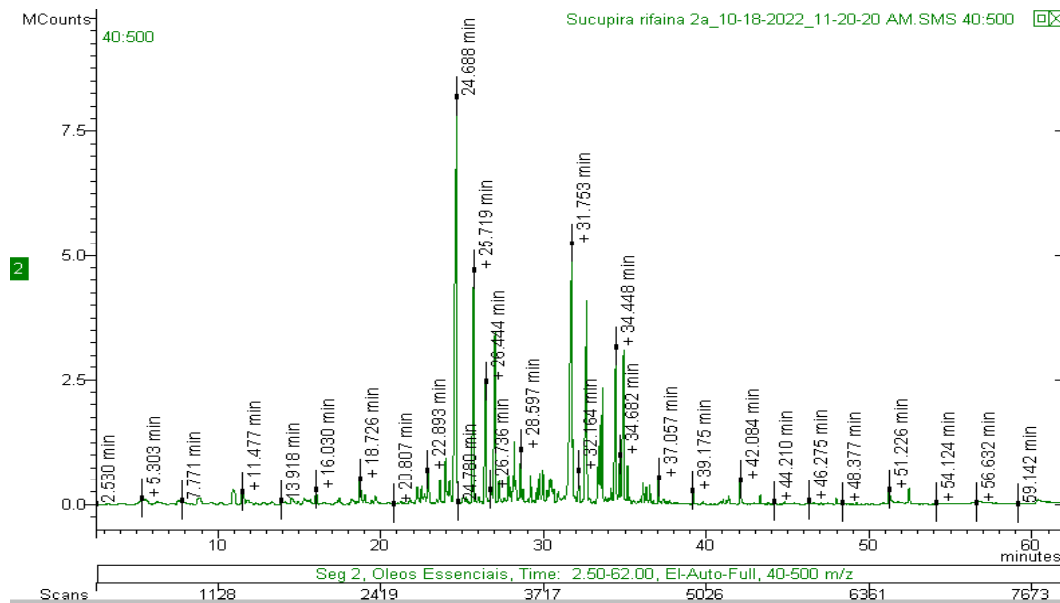
ZHANG, J. M. Cytokines, Inflammation and Pain. **International Anesthesiology Clinics**, v.45, n.2, p.27-37, 2007.

APÊNDICES

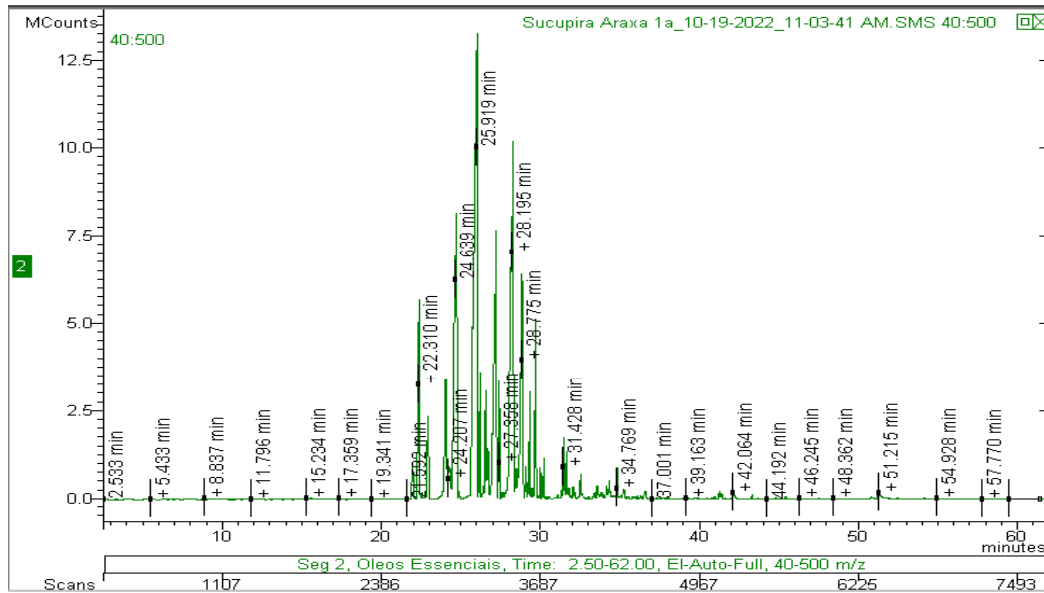
APÊNDICE 1- CROMATOGRAMA OBTIDO POR HS-SPME-GC-MS DOS FRUTOS DE *P. ermaginatus* COLETADOS EM ALTINÓPOLIS/SP



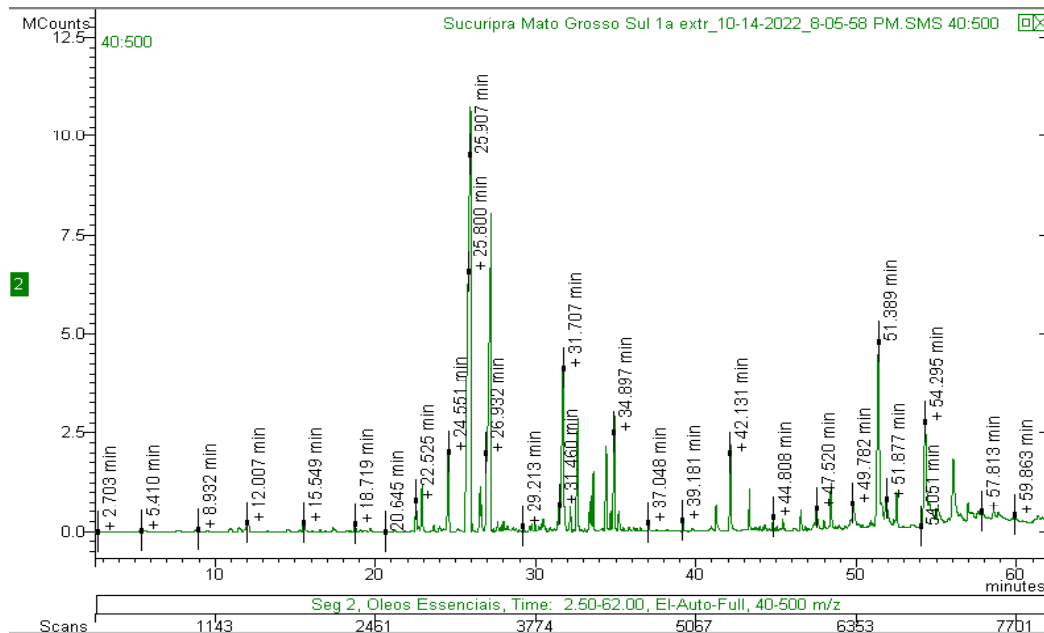
APÊNDICE 2- CROMATOGRAMA OBTIDO POR HS-SPME-GC-MS DOS FRUTOS DE *P. ermaginatus* COLETADOS EM RIFAINA/SP



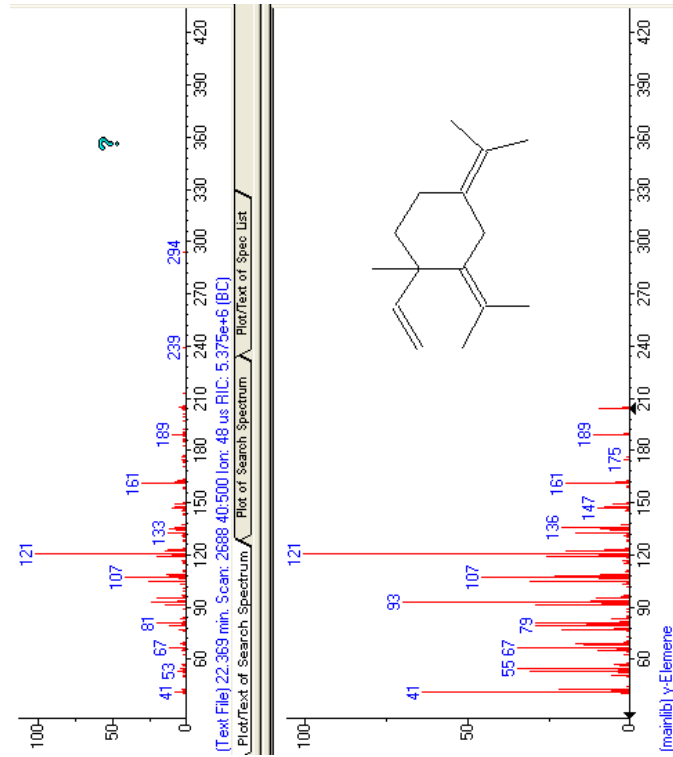
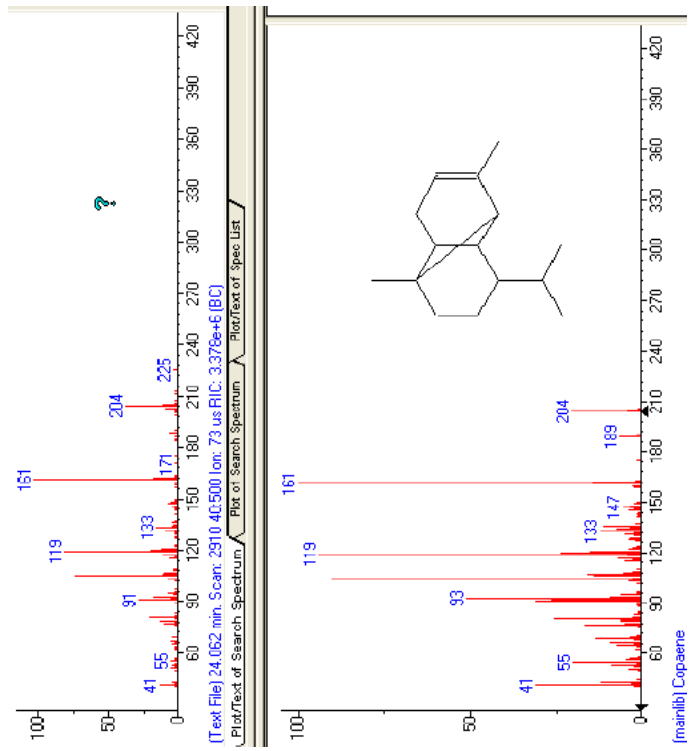
APÊNDICE 3- CROMATOGRAMA OBTIDO POR HS-SPME-GC-MS DOS FRUTOS DE *P. ermagnatus* COLETADOS EM ARAXÁ/MG

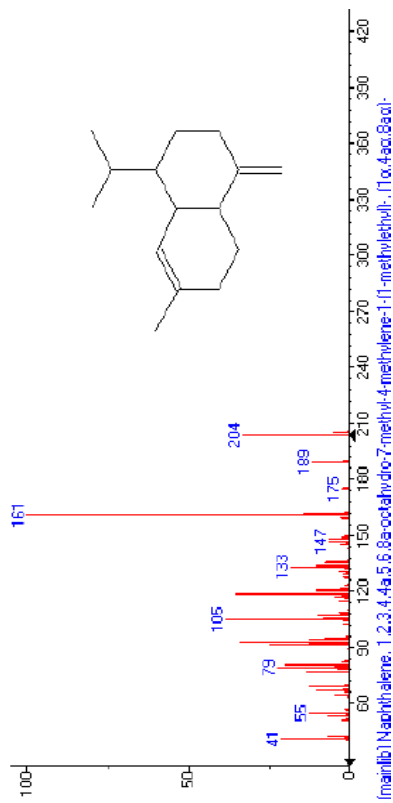
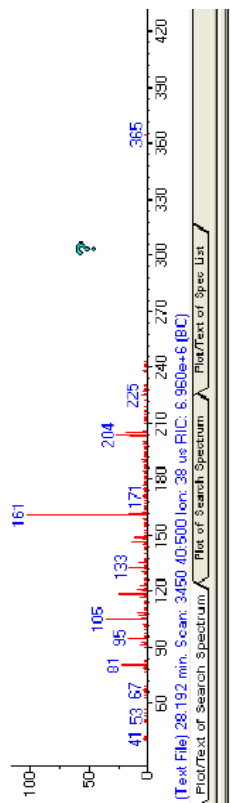
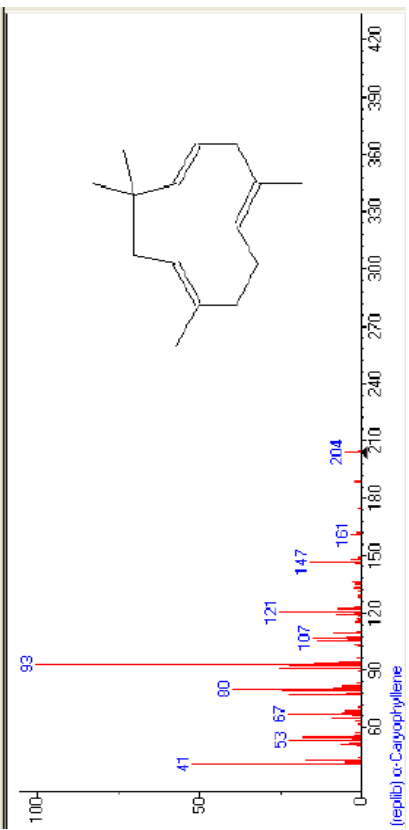
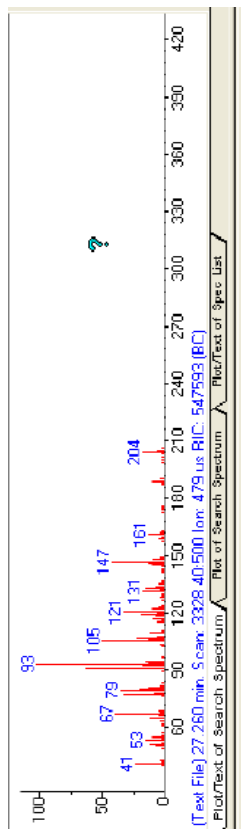


APÊNDICE 4- CROMATOGRAMA OBTIDO POR HS-SPME-GC-MS DOS FRUTOS DE *P. ermagnatus* COLETADOS EM INOCÊNCIA/MS

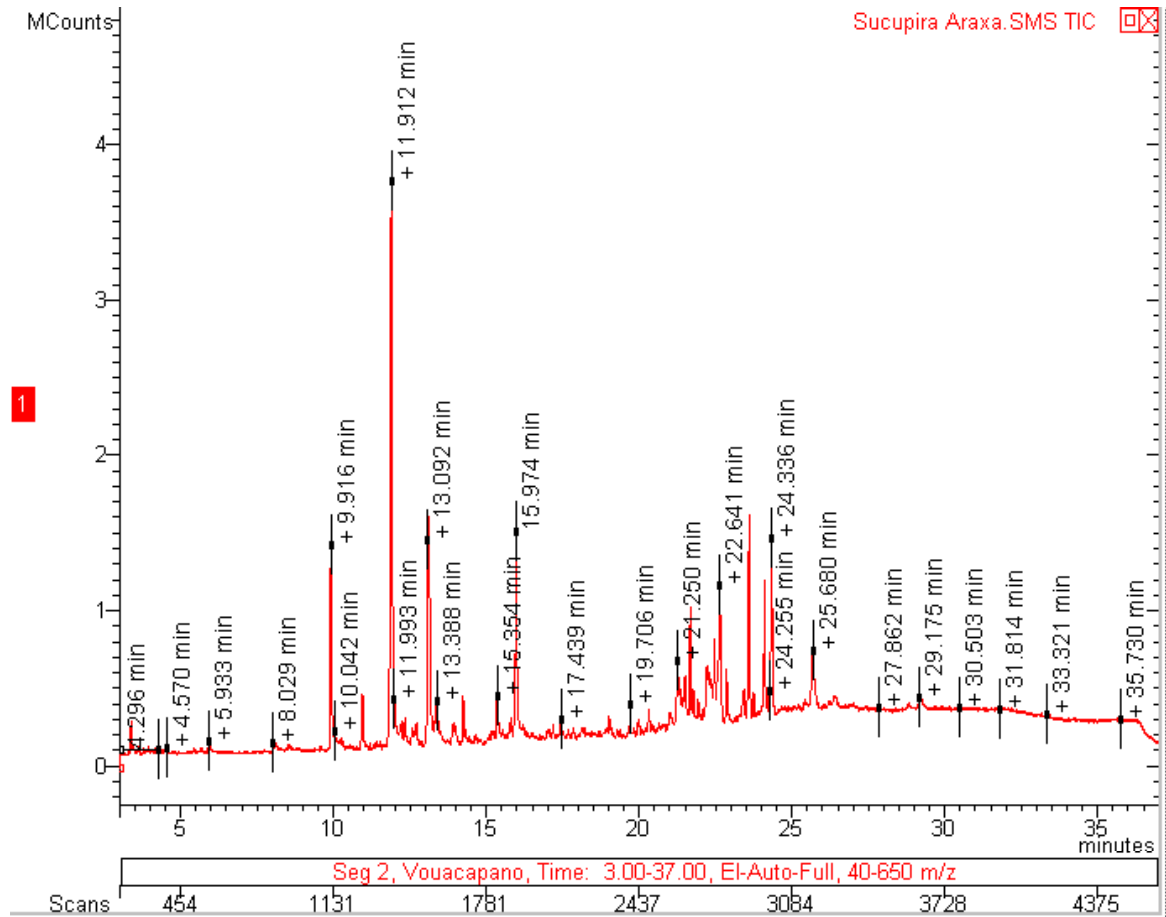


APÊNDICE 5- ESPECTRO DE MASSAS DE SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS

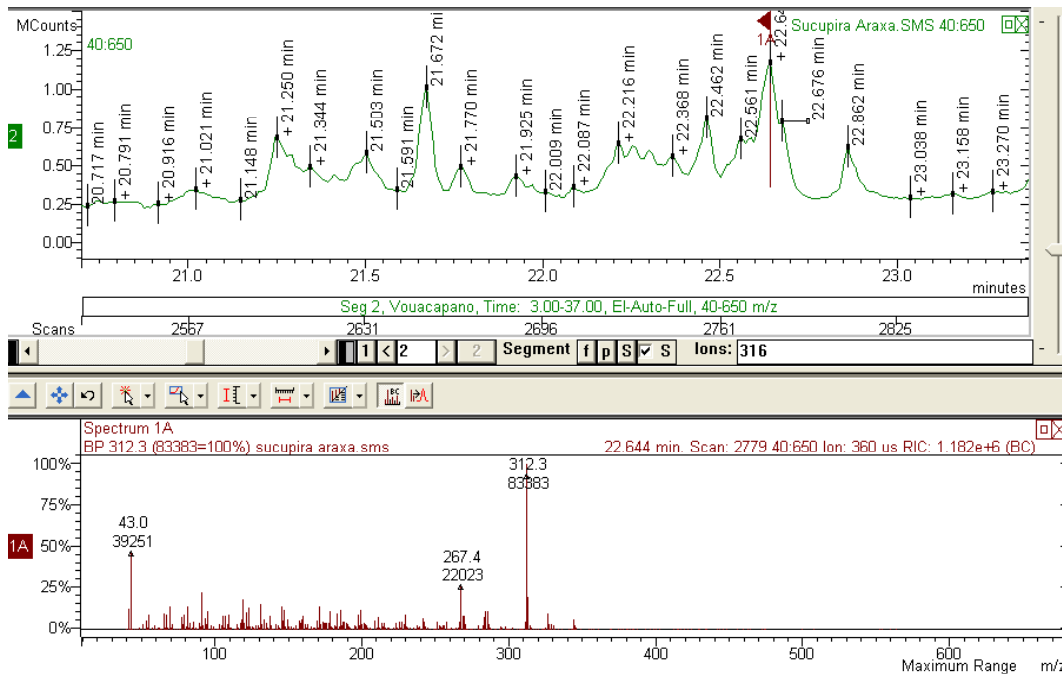




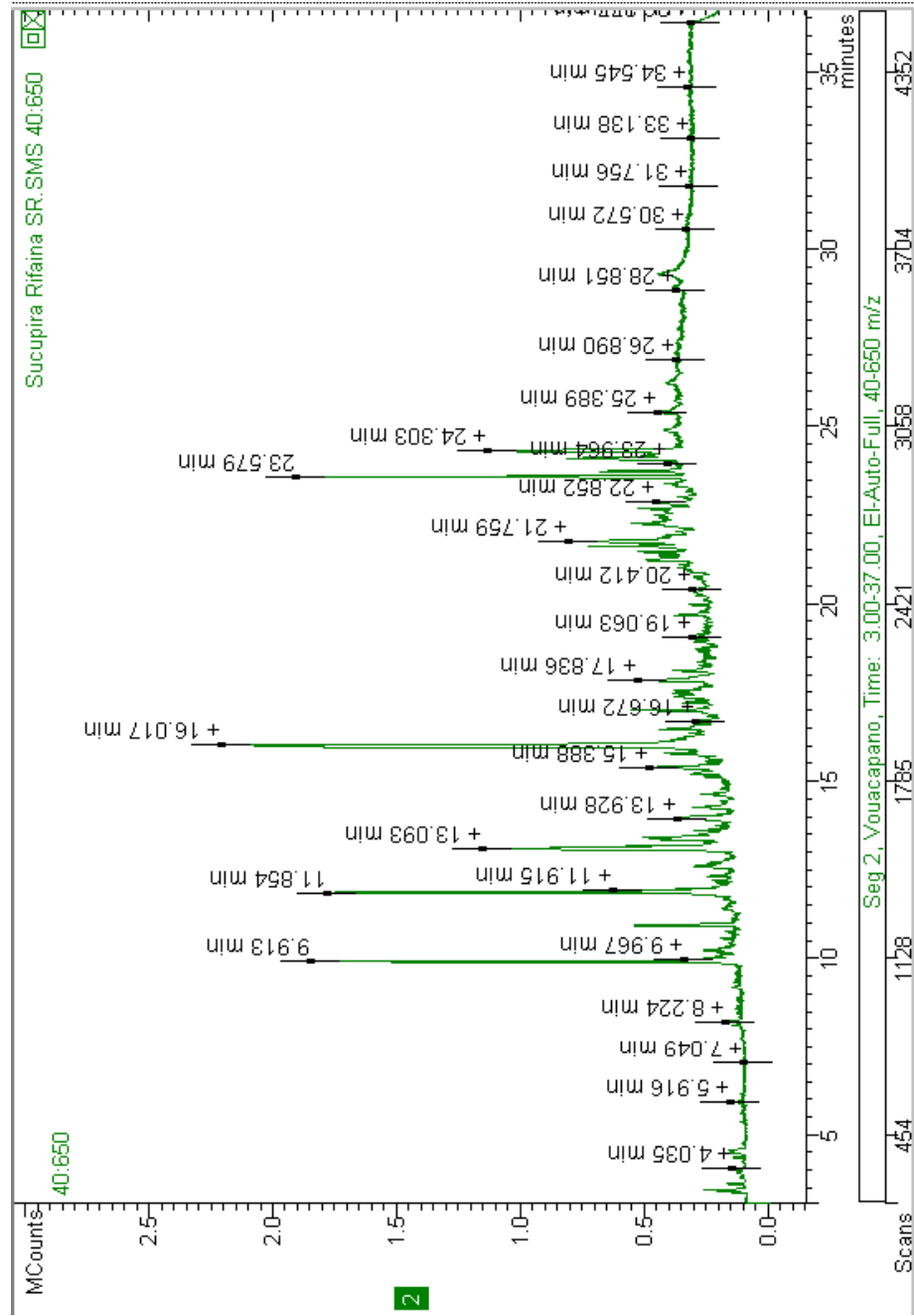
APÊNDICE 6- CROMATOGRAMA OBTIDO POR GC-MS DOS EXTRATOS
OLEAGINOSOS DE *P. ermaginatus* - ARAXÁ/MG



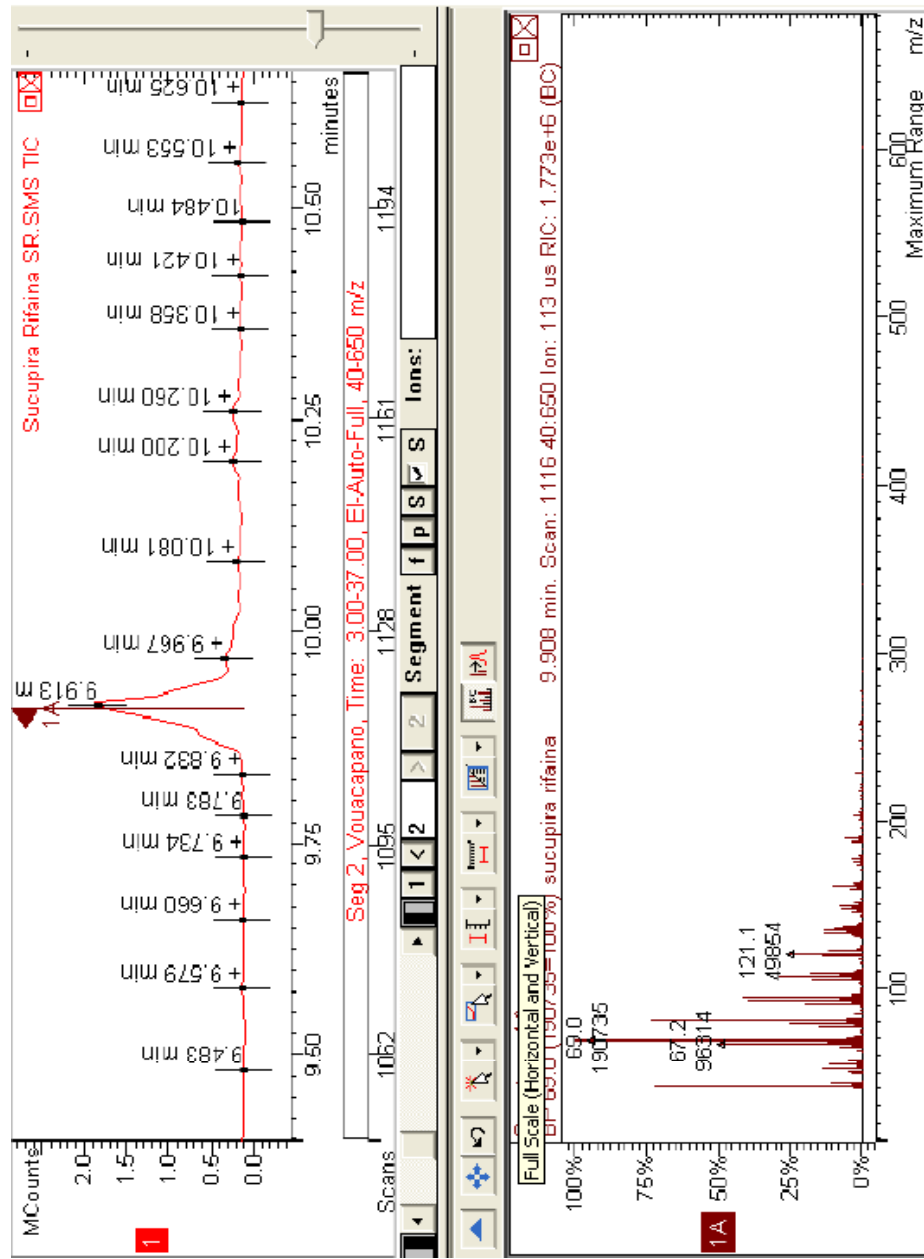
APÊNDICE 7. ESPECTRO DE MASSAS DA DO DITERPENEO *6A-HIDROXI-7B-ACETOXIVOUCAPAN-17B-OATO DE METILA*



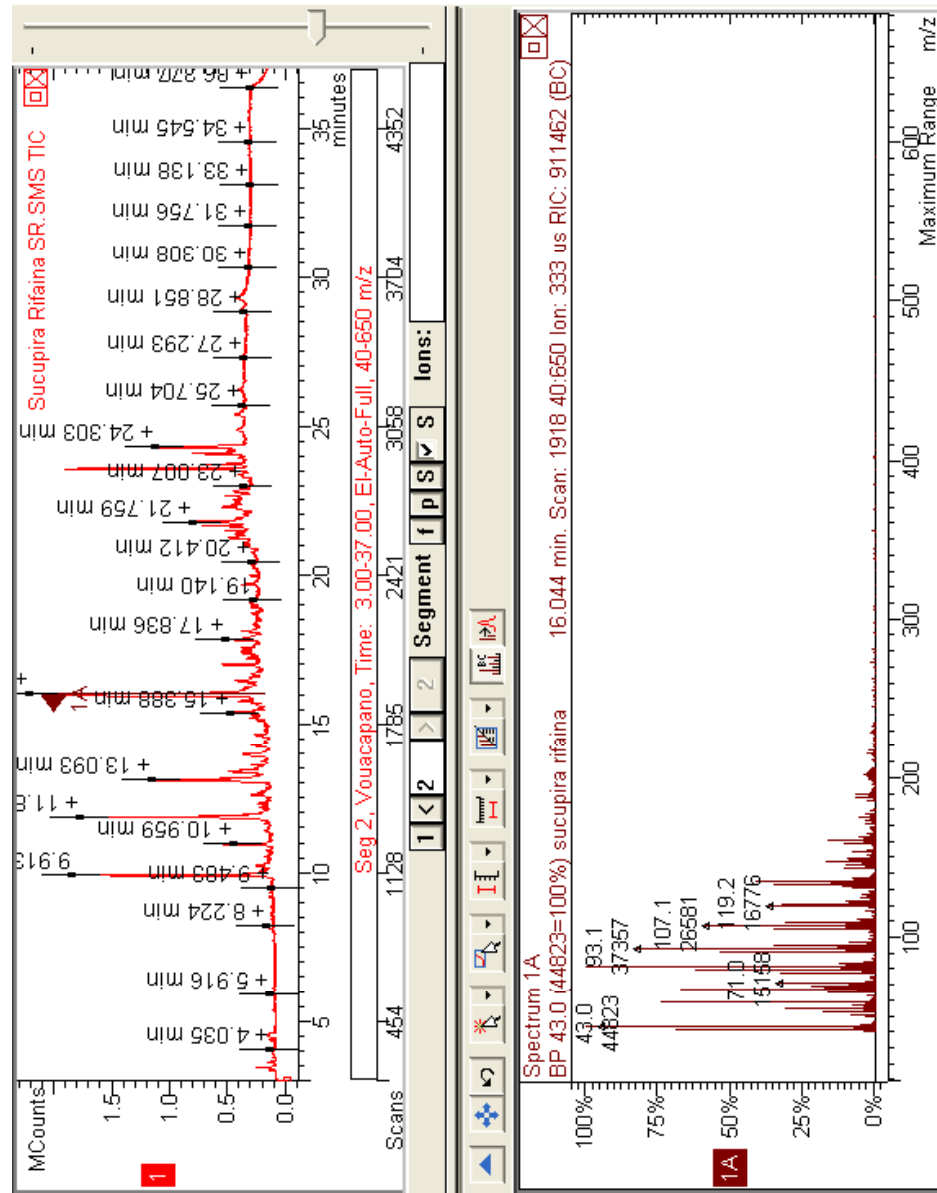
APÊNDICE 8- CROMATOGRAMA OBTIDO POR GC-MS DOS EXTRATOS OLEAGINOSOS DE *P. erragnatus* - RIFAINA/SP



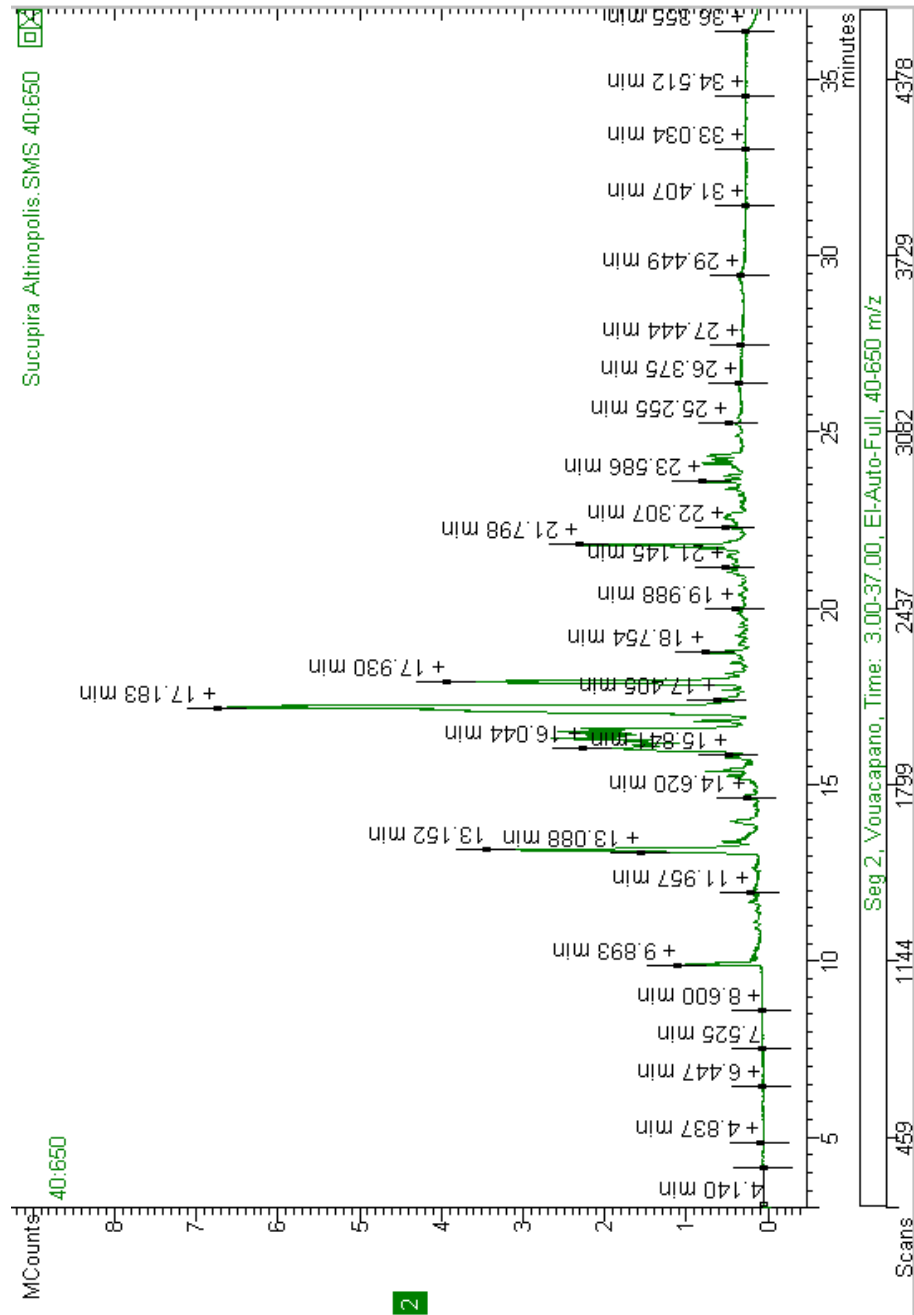
APÊNDICE 9- ESPECTRO DE MASSAS DO DITERPENOIDE GERANILGERANIOL



APÊNDICE 10- ESPECTRO DE MASSAS DO DITERPENOIDE 14,15-EPOXY-GERANILGERANIOL



APÉNDICE 11- CROMATOGRAMA OBTIDO POR GC-MS DOS EXTRATOS OLEAGINOSOS DE *P. ermaginatus* - ALTINÓPOLIS/SP



2

APÊNDICE 12- CROMATOGRAMA OBTIDO POR GC-MS DOS EXTRATOS OLEAGINOSOS DE *P. eruginatus* - INOCÊNCIA/MS

