

UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ADRIANA PATRICIA LAURENTI COELHO

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE *Myrsine leuconeura* Mart.
(PRIMULACEAE)**

RIBEIRÃO PRETO
2023

ADRIANA PATRICIA LAURENTI COELHO

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE *Myrsine leuconeura* Mart.
(PRIMULACEAE)**

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. Ana Maria Soares Pereira

Ribeirão Preto
2023

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

- Universidade de Ribeirão Preto -

COELHO, Adriana Patricia Laurenti, 1975-
C672e Estudo químico e avaliação das atividades antimicrobiana e
antioxidante de *Myrsine leuconeura* Mart. (PRIMULACEAE) / Adriana
Patricia Laurenti Coelho. – Ribeirão Preto, 2024.
82 f. : il. color.

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

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

1. Antibacterianos. 2. Antioxidantes. 3. Benzoquinonas. 4.
Caenorhabditis elegans. II. Título.

CDD 660

ADRIANA PATRÍCIA LAURENTI COELHO

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E
ANTIOXIDANTE DE *Myrsine leuconeura* Mart. (PRIMULACEAE)**

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

Área de Concentração: Doutorado em Biotecnologia

Data da defesa: 29 de novembro de 2023

Resultado: Aprovada

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

Profa. Dra. Vanessa Leiria Campo
Centro Universitário Barão de Mauá

Profa. Dra. Juliana da Silva Coppede
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP

**RIBEIRÃO PRETO
2023**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai,
meu grande amigo de ontem,
hoje e pela eternidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela beleza da vida.

À Profa. Dra. Silvia Helena Taleb Contini por me receber em seu laboratório e incentivar, ensinando sempre com dedicação e paciência.

Aos meus filhos, Thiago Laurenti Coelho e Lucas Laurenti Coelho; aos meus pais, Antonio Edson Laurenti “in memoriam” e Maria Conceição Monteiro Laurenti, pois o apoio da minha família sempre foi e sempre será fundamental para a realização de qualquer projeto.

Ao meu marido, Marcelo Donzeli Coelho, por acreditar em mim e me apoiar em todos os momentos.

À Profa. Dra. Juliana da Silva Coppede, pela colaboração nos experimentos de DPPH.

À Dra. Edieidia Souza Pina e ao farmacêutico Miguel Augusto de Moraes, pela colaboração nos experimentos de atividade antimicrobiana.

Ao Prof. Dr. André Pitondo da Silva, pela parceria científica.

À Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida, por disponibilizar a infraestrutura do seu departamento e pela parceria científica.

Aos coordenadores, docentes e funcionários do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto-UNAERP pelos ensinamentos e atenção dispensados.

À Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira, pela co-orientação deste trabalho.

À Dra. Bianca Waléria Bertoni, pela colaboração na realização das análises estatísticas.

À Profa. Dra. Marise Conceição Bastos Stevanato, pela confiança e incentivo sempre.

RESUMO

Myrsine leuconeura Mart. é utilizada como tratamento fitoterápico para cólicas renais, calculose renal e infecções urinárias bacterianas. No entanto, até o momento, não há relatos na literatura de estudos avaliando a composição química e os efeitos biológicos ou farmacológicos de entrecascas de *M. leuconeura*, utilizadas na produção de tinturas e alcoolaturas. Este trabalho teve como objetivo estudar a composição química de extrato hidroalcolólico produzido a partir das entrecascas de *M. leuconeura*, além de investigar as atividades antioxidante e antimicrobiana, e a toxicidade, na sobrevivência de *Caenorhabditis elegans*. A fração ML/AcOEt apresentou atividade antioxidante similar à rutina com valor de IC₅₀ de 5,31 µg/mL no ensaio DPPH, enquanto a rapanona apresentou valor de IC₅₀ igual a 177,15 µg/mL. A fração ML/AcOEt apresentou moderada atividade antimicrobiana ante *C. jejuni* ATCC 33291, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *S. enterica* ATCC 9184 (CIM 10 a 100 µg/mL). Para todas as outras linhagens, a fração ML/AcOEt apresentou atividade antimicrobiana baixa (CIM >100 µg/mL). A rapanona apresentou atividade antimicrobiana significativa para as linhagens *E. faecium* ATCC 4083 e *S. aureus* ATCC 25923 (CIM < 10 µg/mL). Para as linhagens *C. jejuni* ATCC 33291, *C. perfringens* ATCC 13124, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 e *S. enterica* ATCC 9184. A substância rapanona apresentou moderada atividade antimicrobiana contra as linhagens *C. jejuni* ATCC 33291, *C. perfringens* ATCC 13124, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 e *S. enterica* ATCC 9184 (CIM 10 a 100 µg/mL). Para as demais espécies bacterianas, a atividade foi baixa (CIM > 100 µg/mL). Os resultados encontrados do teste de toxicidade para ML/AcOEt foram de 98,18 % de sobrevivência para as concentrações de 40 a 80 µg/mL com diminuição a partir de 100 µg/mL, demonstrando uma possível toxicidade da fração avaliada. O resultado do teste de toxicidade para a rapanona foi 92,37 % de sobrevivência em 60 µg/mL com diminuição a partir de 80 µg/mL. Este é o primeiro relato do isolamento de rapanona nas entrecascas de *M. leuconeura*, o que contribui com os conhecimentos sobre a composição química desta espécie.

Palavras-chave: Antibacteriano. Antioxidante. Rapanona. *Caenorhabditis elegans*. Pororoca.

ABSTRACT

Myrsine leuconeura Mart. is used as an herbal treatment for renal colic, kidney stones and bacterial urinary infections. However, to date, there are no reports in the literature of studies evaluating the chemical composition and biological or pharmacological effects of the bark of *M. leuconeura*, used in the production of tinctures and alcoholic drinks. The aim of this work was to study the chemical composition of the hydroalcoholic extract produced from the bark of *M. leuconeura*, as well as to investigate its antioxidant and antimicrobial activities and its toxicity to *Caenorhabditis elegans*. The ML/AcOEt fraction showed antioxidant activity similar to rutin with an IC₅₀ value of 5.31 µg/mL in the DPPH assay, while rapanone showed an IC₅₀ value of 177.15 µg/mL. The ML/AcOEt fraction showed moderate antimicrobial activity against *C. jejuni* ATCC 33291, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 9027 and *S. enterica* ATCC 9184 (MIC 10 to 100 µg/mL). For all the other strains, the ML/AcOEt fraction showed low antimicrobial activity (MIC >100 µg/mL). Rapanone showed significant antimicrobial activity for the strains *E. faecium* ATCC 4083 and *S. aureus* ATCC 25923 (MIC < 10 µg/mL). For the strains *C. jejuni* ATCC 33291, *C. perfringens* ATCC 13124, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 and *S. enterica* ATCC 9184. The substance rapanone showed moderate antimicrobial activity against the strains *C. jejuni* ATCC 33291, *C. perfringens* ATCC 13124, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 and *S. enterica* ATCC 9184 (MIC 10 to 100 µg/mL). For the other bacterial species, the activity was low (MIC > 100 µg/mL). The results of the toxicity test for ML/AcOEt were 98.18 % survival at concentrations of 40 to 80 µg/mL, with a decrease from 100 µg/mL onwards, demonstrating the possible toxicity of the fraction evaluated. The result of the toxicity test for rapanone was 92.37 % survival at 60 µg/mL with a decrease from 80 µg/mL. This is the first report of the isolation of rapanone in the bark of *M. leuconeura*, which contributes to knowledge about the chemical composition of this species.

Keywords: Antibacterial. Antioxidant. Rapanone. *Caenorhabditis elegans*. Pororoca.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração do formato das espécies de <i>Myrsine</i>	18
Figura 2 - Esquema da sincronização para obtenção de ovos e nematoides no estágio L4.	34
Figura 3 - Aparência visual dos nematoides no teste de toxicidade.....	35
Figura 4 - Estrutura molecular das substâncias Rapanona e Suberonona.....	40
Figura 5 - Curva padrão da rutina utilizada no ensaio de DPPH.....	43
Figura 6 - Curva padrão da fração acetato utilizada no ensaio de DPPH.....	44
Figura 7 - Curva padrão da rapanona utilizada no ensaio de DPPH.....	44
Figura 8 - Ensaio de toxicidade com nematoides selvagens N2 estágio L4.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das quinonas quanto ao sistema aromático.....	19
Tabela 2 - Meios de cultura utilizados para cultivo dos micro-organismos e da atividade antimicrobiana.....	36
Tabela 3 - Dados espectrais da mistura das substâncias rapanona e suberonona.....	41
Tabela 4 - Resultados da análise da fração acetato de etila ML/ACOEt por CG-EM.....	42
Tabela 5 - Valores da concentração inibitória mínima (CIM, $\mu\text{g/mL}$) para as amostras avaliadas frente a cada linhagem bacteriana.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etila
Aq	Aquosa
ATP	Adenosina trifosfato
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CC	Coluna cromatográfica
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Ultravioleta
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila (radical livre)
DPPH-H	2,2-difenilpicril-hidrazina (não radical)
EM	Espectrometria de Massas
EML	Extrato <i>Myrsine leuconeura</i>
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
GABA _A	Ácido gama-aminobutírico
GFP	Green Fluorescent Protein
Hex	Hexano
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IC	Inhibitory Concentration
IV	Espectroscopia de Infravermelho
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
KPO ₄	Fosfato de potássio
LB	Lysogeny Broth
MCF-7	Adenocarcinoma mamário
MeOH	Metanol
Mg ₂ SO ₄	Sulfato de magnésio
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
NF-KB	Fator nuclear kappa-b
NGM	Nematode Growth Medium
NO•	Óxido nítrico
O ₂ •-	Superóxido
O ₃	Ozônio
OH•	Radical hidroxil
ONOO-	Peroxinitrito
RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
RS•	Radicais derivados de tióis
TSA	Typticase soy agar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 A FAMÍLIA PRIMULACEAE	15
2.2 O GÊNERO <i>Myrsine</i> L.	16
2.3 A ESPÉCIE <i>Myrsine leuconeura</i> MART.	17
2.4 DERIVADOS DE 1,4-HIDROXIBENZOQUINONAS	18
2.4 PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE	20
2.5 <i>Caenorhabditis elegans</i>	21
2.6 PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA	23
3 JUSTIFICATIVA	25
4 HIPÓTESE.....	26
5 OBJETIVOS	27
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
6 MATERIAL E MÉTODOS	28
6.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	28
6.2 OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO	28
6.3 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA - ML/ACOET	28
6.3.1 Purificação das Subfrações N e P	29
6.3.2 Purificação da Subfração RC.....	29
6.4 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL	30
6.5 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM).	30
6.5.1 Análise de Fração Acetato de Etila “ML/AcOEt por CG-EM	30
6.5.2 Análise das Amostras R1 e R2	30
6.6 ENSAIO ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> : DPPH•	31

6.6 ENSAIO DE TOXICIDADE NO MODELO IN VIVO <i>Caenorhabditis elegans</i>	32
6.6.1 Linhagem e Manutenção de <i>C. elegans</i>	32
6.6.2 Isolamento e Cultivo de <i>E. coli</i>	33
6.6.3 Sincronização.....	33
6.6.4 Ensaio de Toxicidade.....	34
6.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERIANA.....	35
6.7.1 Espécies Bacterianas.....	35
6.7.2 Determinação da Concentração Inibitória e Bactericida Mínima da Fração Acetato e Substância Isolada de <i>M. leuconeura</i>	37
7 RESULTADOS	39
7.1 OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO	39
7.2 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS E PURIFICADOS	39
7.2.1 Identificação Estrutural das Amostras R1 e R2.....	39
7.2.2 Análise da Fração Acetato de Etila ML/ACOEt por CG-EM.	42
7.3 ENSAIO ANTIOXIDANTE POR REDUÇÃO DO RADICAL DPPH•	43
7.4 ENSAIO DE TOXICIDADE NO MODELO IN VIVO <i>Caenorhabditis elegans</i>	45
7.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	46
8 DISCUSSÃO	48
9 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXOS.....	60

1 INTRODUÇÃO

Ao longo da evolução humana, e através da busca de alimentos para sua sobrevivência, o homem descobriu as propriedades terapêuticas e toxicológicas das plantas, acumulando a sabedoria de utilizá-las para fins medicinais. Assim, todo o conhecimento, etnofarmacológico, adquirido pelo homem, aliado aos estudos que visam identificar os metabólitos vegetais responsáveis pelas atividades biológicas e/ou farmacológicas das plantas medicinais, são de importância para que se possa validar cientificamente a utilização da fitoterapia.

Os compostos naturais derivados de plantas, provenientes do seu metabolismo secundário são a principal fonte de novas estruturas químicas com potencial uso na indústria farmacêutica. O avanço científico e o desenvolvimento de técnicas para isolamento e purificação de biomoléculas têm aumentado o interesse por estudos com plantas medicinais para o desenvolvimento de novos fármacos e novas opções de tratamento de enfermidades que acometem a população.

Em 2018, os fitoterápicos foram responsáveis pela movimentação de 30 bilhões de dólares no mercado farmacêutico mundial, demonstrando o crescente interesse das indústrias farmacêuticas em investir nas pesquisas que visam a descoberta de produtos naturais bioativos que possam ser utilizados como matéria prima para a produção de novos fármacos (Carvalho *et al.*, 2018).

No Brasil, pesquisas na área de produtos naturais têm merecido destaque devido à expressiva biodiversidade encontrada no país, o que tem despertado a atenção da comunidade científica internacional, principalmente em função do grande potencial medicinal das espécies vegetais

Entre as famílias vegetais presentes no Cerrado e nos complexos similares, encontra-se a Primulaceae que possui como sinônimo Myrsinaceae, formada por plantas angiospermas, na forma de árvores, arbustos e subarbustos, com aproximadamente 58 gêneros e 2.590 espécies, distribuídas na região pantropical do mundo.

Myrsine L. (Sin. *Rapanea*) é considerado o gênero de maior diversidade da família Primulaceae, e está representado por 26 espécies brasileiras das quais, 16 delas são endêmicas. Suas espécies são utilizadas para o tratamento de dor, processos inflamatórios, afecções de vias urinárias, fígado, reumatismo, eczemas, coceiras, erupções e urticárias,

sendo possível encontrar na literatura, estudos referentes à composição química e aos ensaios farmacológicos realizados com diferentes espécies do gênero.

A espécie *Myrsine leuconeura* L. Mart. é utilizada como tratamento fitoterápico para tratar cólicas renais, calculose renal e infecções urinárias bacterianas. No entanto, até o momento, não há relatos na literatura de estudos avaliando a composição química e os efeitos biológicos ou farmacológicos de entrecascas de *M. leuconeura*, utilizadas para a produção de tinturas e alcoolaturas.

Com base no exposto, o objetivo deste trabalho consistiu em avaliar a composição química e as atividades antioxidante e antibacteriana da espécie *M. leuconeura*, com o intuito de contribuir com novos dados que visem assegurar a qualidade, segurança e eficácia de fitoterápicos produzidos com a espécie alvo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A FAMÍLIA PRIMULACEAE

No Brasil, pesquisas na área de produtos naturais têm merecido destaque, devido à grande biodiversidade encontrada no país, o que tem despertado a atenção da comunidade científica internacional, principalmente pelo potencial medicinal das espécies vegetais (Berlinck *et al.*, 2017; Montanari; Bolzani, 2001).

O avanço científico e o desenvolvimento de técnicas cromatográficas têm contribuído com o aumento do número de pesquisas que visam o isolamento e purificação de biomoléculas, com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos e novas opções de tratamento de enfermidades para a população (Macias *et al.*, 2008).

Entre as famílias vegetais, presentes no cerrado e nos complexos similares, encontra-se a Primulaceae, que possui como sinônimo Myrsinaceae, formada por plantas angiospermas, na forma de árvores, arbustos e subarbustos, com aproximadamente 58 gêneros e 2.590 espécies, distribuídas na região pantropical do mundo, e subordinadas às subfamílias Maesoideae, Theophrastoideae, Myrsinoideae e Primuloideae (Stahl; Anderberg, 2004).

Freitas e colaboradores (2015, 2017) demonstraram que, no Brasil, a família Primulaceae está representada por 11 gêneros e são eles: *Ardisia* Sw., *Clavija* Ruiz & Pav., *Ctenardisia* Ducke, *Cybianthus* Mart., *Geissanthus* Hook.f., *Jacquinia* L., *Lysimachia* L., *Myrsine* L., *Parathesis* (A.DC.) Hook.f., *Samolus* L., *Stylogyne* A.DC, além de outros 7 sinônimos. Dentre as espécies, 140 são aceitas, sendo a maioria delas pertencente à subfamília Myrsinoideae (Myrsinaceae) com aproximadamente 100 espécies. No estado de São Paulo são encontrados três gêneros: *Ardisia* Sw., *Cybianthus* Mart. e *Myrsine* L. (Sin. *Rapanea*) (Freitas; Kinoshita, 2015; Freitas; Carrijo; De Luna, 2017).

Espécies pertencentes à Myrsinoideae apresentam diferentes tipos de estruturas secretoras, tais como os tricomas glandulares, hidatódios e cavidades secretoras, sendo estas utilizadas para segregar o clado formado por *Lysimachia* L., *Myrsine* L. e *Primula* L., em duas sub-famílias: Primuloideae, a qual contém espécies que não apresentam cavidades secretoras, e Myrsinoideae, a qual inclui espécies com cavidades secretoras (Luna *et al.*, 2013).

Quimicamente, a família Primulaceae é caracterizada pela presença de hidroxibenzoquinonas (Ogawa; Natori, 1968), substâncias essas produzidas, somente nos

órgãos vegetativos e reprodutivos de plantas pertencentes aos gêneros que apresentam cavidades secretoras internas (Myrsinoideae) (Judd *et al.*, 2008).

A composição dos derivados de hidroxibenzoquinonas varia de acordo com a espécie que os produz, possibilitando assim, que tais substâncias sejam utilizadas como marcadores quimiotaxonômicos entre os representantes de Myrsinoideae (Ogawa; Natori, 1968; Otegui *et al.*, 1998). Por exemplo, embelina é o constituinte majoritário em Myrsinoideae, enquanto que para a subfamília Maesodae, a substância maesaquinona, juntamente com seu derivado acetilado, é considerada o seu marcador quimiotaxonômico (Ntalli; Caboni, 2012).

2.2 O GÊNERO *Myrsine* L.

Myrsine L. (Sin. *Rapanea*) é considerado o gênero de maior diversidade da família Primulaceae, e está representado por 26 espécies brasileiras das quais, 16 delas são endêmicas (Freitas; Kinoshita, 2015).

O gênero *Rapanea*, foi descrito por Aublet em 1775, e sinonimizado em *Myrsine* L. por De Candolle, em 1834, cujo nome foi aceito por Miquel em 1856 na Flora Brasiliensis. Mez (1902) revalidou *Rapanea*, utilizando como critério de diferenciação entre estes dois gêneros a presença ou ausência de um curto estilete. Desde então, diversos trabalhos foram publicados discutindo a revalidação de *Rapanea* (Freitas; Kinoshita, 2015).

Estudos taxonômicos foram realizados com 23 espécies do gênero *Myrsine* (Primulaceae) que ocorrem nas regiões sul e sudeste do Brasil, cujos materiais analisados foram provenientes de herbários nacionais e estrangeiros. Neste trabalho, também foram consideradas todas as espécies descritas em *Rapanea* (considerada como sinônimo), sendo que o gênero está representado por árvores de até 20 m, arvoretas ou arbustos dioicos, com inflorescência axilar, racemiforme, umbeliforme ou glomeriforme. Flores apresentando 4-5(6)-meras, unissexuadas, cálice e corola variadamente soldados, com glândulas alongadas a arredondadas, ou raramente ausentes, vinosas, ocráceas ou transparentes; estames inseridos na fauce, anteras sésseis; estigma sésil, variadamente lobado. Drupa esférica ou elipsóide, endocarpo pétreo, coriáceo ou lenhoso. Além disso, descrições com o intuito de ampliar as informações de espécies, conhecidas até então por obras originais, corroboraram com a ampla circunscrição do gênero *Myrsine*, o qual inclui *Rapanea* Aublet (Freitas; Kinoshita, 2015).

Na medicina popular, espécies de *Myrsine* L. são utilizadas para o tratamento de dor, processos inflamatórios, afecções de vias urinárias, fígado, reumatismo, eczemas, coceiras, erupções e urticárias, sendo possível encontrar na literatura, estudos referentes à composição química e aos ensaios farmacológicos realizados com diferentes espécies do gênero (De Melo Burger *et al.*, 2015; Makabe *et al.*, 2003).

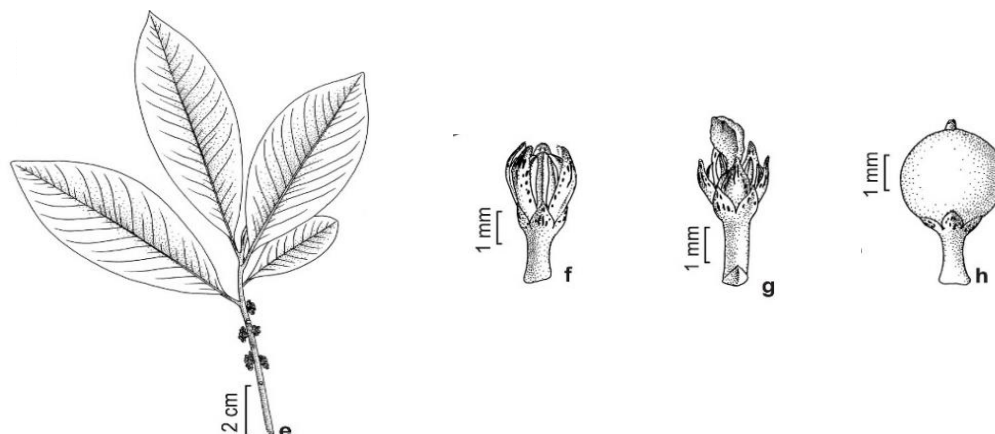
A espécie *Myrsine leuconeura* L. Mart. é usada por grupos étnicos no Brasil para tratar cólicas renais, calculose renal e infecções do trato urinário (Pereira *et al.*, 2014; Inácio *et al.*, 2013). Mas, até o momento, não há relatos de estudos avaliando a composição química de suas entrecasas, utilizadas para a produção dos fitoterápicos.

2.3 A ESPÉCIE *Myrsine leuconeura* Mart.

Espécies de *Myrsine* são conhecidas popularmente no Brasil como caapororoca, capororoca e pororoca, apresentando 24 espécies, distribuídas nos estados de Goiás, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. No estado de São Paulo são encontradas 14 espécies (Freitas; Kinoshita, 2015).

Uma chave para a identificação da espécie *Myrsine leuconeura* Mart. são seus ramos terminais glabros ou com tricomas nas gemas apicais, inflorescências esparsas nos ramos, com 5-8 flores, pedicelos de 1,5 -2 mm de comprimento e frutos de 3-4 mm de comprimento. As plantas apresentam caule esbranquiçado, com muitas lenticelas, e as folhas adultas herborizadas têm a nervura mediana geralmente mais clara que o limbo. Espécie vegetativamente muito semelhante a *M. umbellata*, diferenciando-se desta pelas folhas menores e elípticas, pedicelos menores e inflorescências pouco densas e esparsamente distribuídas nos ramos (Figura 1) (Freitas; Kinoshita, 2015).

Figura 1: Ilustração do formato das espécies de *Myrsine*.



Fonte: adaptada de FREITAS; KINOSHITA, 2015 p. 167-189.

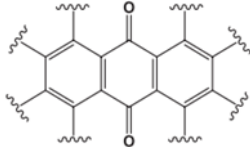
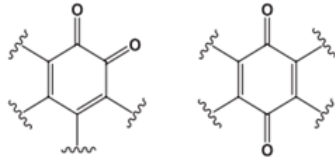
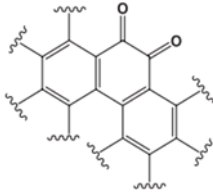
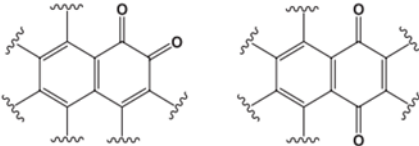
Nota: e-h. *M. leuconeura*. e. ramo com flores, f. flor estaminada, g. flor pistilada, h. fruto. (e, g. Tameirão Neto 2064, f. Pedralli s.n. HBXH 11900, h. Lombardi 2039).

2.4 DERIVADOS DE 1,4-HIDROXIBENZOQUINONAS

As substâncias 1,4-benzoquinona pertencem à classe dos quinonoides, os quais possuem como estrutura básica dois grupamentos carbonilas em um anel insaturado de seis átomos de carbono, situados relativamente em posições *orto* ou *para*. Tais substâncias são classificadas, segundo o critério aromático, em benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas e fenantraquinonas como demonstrado na Tabela 1 (Sousa; Lopes; Andrade, 2016).

Substâncias da classe das quinonas são encontradas, predominantemente, em plantas, bactérias, fungos e artrópodes. Nos últimos anos, a descoberta de suas propriedades farmacológicas, tais como, antibiótico, antitumoral, antimalárica, anticoagulante e atividades herbicida tem despertado o interesse entre os cientistas para explorar essas propriedades (Abraham; Pardasani; Pardasani, 2011).

Tabela 1: Classificação das quinonas quanto ao sistema aromático.

Grupo	Sistema Aromático	Estruturas Básicas
Antraquinonas	Anel antracênico	
Benzoquinonas	Anel benzênico	
Fenantraquinonas	Anel fenantrênico	
Naftoquinonas	Anel naftalênico	

Fonte: SOUSA; LOPES; ANDRADE, 2016, p. 486-495.

Derivados de 2,5-dihidroxi-3-alkuil-1,4-benzoquinonas estão entre os princípios ativos encontrados em algumas das espécies de Primulaceae utilizadas na medicina tradicional para diferentes fins terapêuticos, sendo que um grande número de espécies de árvores pertencentes ao gênero *Myrsine* amplamente utilizado na fitoterapia, tem sido investigado quimicamente, com o intuito de elucidar quais metabólitos secundários estão envolvidos na ação terapêutica destas espécies (Manguro *et al.*, 2003; Kuruvilla *et al.*, 2010).

De acordo com a literatura, diversas atividades biológicas, também têm sido descritas para os derivados de 2,5-dihidroxi-3-alkuil-1,4-benzoquinonas, tais como: antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, antiparasitário, antibacteriana e citotóxica (Shah; Sunder, Souza, 1987; Ospina *et al.*, 2001; Kuete *et al.*, 2017; Vega-Hernández *et al.*, 2017).

A rapanona (2,5-dihidroxi-3-tridecilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona) é um importante exemplo de substâncias da classe das quinonas, com grande interesse entre os cientistas que visam explorar o uso de substâncias de origem natural como fonte de novos fármacos, em virtude de suas propriedades biológicas e farmacológicas (Awinoa *et al.*, 2008; Abraham *et al.*, 2011; Da Costa *et al.*, 2014; Kumar; Deshmukh, 2017).

2.4 PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE

A geração de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico no cumprimento de funções biológicas relevantes. Nos processos metabólicos, atuam como mediadores da transferência de elétrons, possibilitam a geração de adenosina trifostato (ATP), a fertilização do óvulo, a ativação de genes, e a participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção. Essa produção contínua de radicais livres é controlada por mecanismos de defesa antioxidantes que limitam os níveis intracelulares de espécies reativas e os danos causados por seu aumento (Barbosa *et al.*, 2010).

Dentre as espécies reativas mais estudadas nos sistemas biológicos, estão as espécies reativas de oxigênio (ERO), as espécies reativas de nitrogênio (ERN), os radicais derivados de tióis ($RS\bullet$), as espécies reativas de cloro, as espécies reativas de carbono e complexos de metais de transição, principalmente Fe, Cu, Mn e Cr (Vasconcelos *et al.*, 2007).

As espécies reativas incluem espécies radicais livres ou radicalares, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxil ($OH\bullet$), óxido nítrico ($NO\bullet$) e outras que não possuem elétrons desemparelhados ou não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$), e outras espécies capazes de formas radicais livres no organismo humano (IO_2^* , O_3 , Fe, Cu) (Vasconcelos *et al.*, 2007). A alta reatividade das espécies reativas permite a reação com as moléculas mais próximas, tornando estas em novos radicais livres, iniciando uma reação em cadeia, com rápida oxidação de biomoléculas vizinhas, podendo alterar o funcionamento normal das células ao redor (Warren; Johnson, Ward, 1987).

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre, entre outras, e a remoção destas pelos sistemas químicos e enzimáticos de defesa antioxidante e, também, pelo reparo enzimático das biomoléculas lesadas (Schafer; Buettner, 2001). Há fortes evidências do impacto do estresse oxidativo em processos de envelhecimento, transformação e morte celular, com consequências diretas em processos patológicos como a indução do câncer incluindo doenças cardiovasculares, distúrbios neurais, doença de Parkinson, doença hepática induzida pelo álcool, aterosclerose, câncer e causas do envelhecimento (Alam *et al.*, 2013).

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pelas espécies reativas, através de sistema enzimático ou não-enzimático, sendo que neste último, as substâncias podem ter origem endógena ou dietética como, por exemplo,

vitaminas A, B e E, Cu, Zn, Mn, Se, e fitoquímicos como resveratrol, catequinas, quercetinas, ácidos fenólicos e outros (El-Haeary *et al.*, 2020). Algumas plantas já são conhecidas por sua ação como, por exemplo, o alecrim, a sálvia, o manjeriço, as frutas cítricas, a uva, entre outras, por serem ricas fontes de antioxidantes (Angelo; Jorge, 2007).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para a avaliação *in vitro* da atividade antioxidante de amostra de interesse, como por exemplo, o método de sequestro de radicais livres DPPH•. Este está baseado no descoramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH• de cor violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H) (Alves *et al.*, 2010). É considerado um método rápido e simples, com utilização de poucas quantidades de amostra e solventes (Pires *et al.*, 2017).

Outro método utilizado, é a utilização do verme nematoide *Caenorhabditis elegans*, um modelo eucarioto já bem conhecido no estudo *in vivo* da atividade antioxidante de metabólitos secundários de espécies vegetais, devido a técnica simples e sua similaridade com marcadores humano (Iwasa *et al.*, 2010).

2.5 *Caenorhabditis elegans*

Em 1974, Sidney Brenner se apoiou no conhecimento detalhado da anatomia e desenvolvimento do *C. elegans* para desenvolver seus estudos neurobiológicos e tornou os nematoides o foco para a busca do conhecimento da biologia molecular. Enquanto Sulston em 1983, juntamente com outros pesquisadores descreviam a primeira linhagem celular completamente conhecida de um organismo multicelular, a partir do estudo de todas as divisões celulares do nematoide, desde o zigoto até o macho adulto e hermafrodita (Sulston *et al.*, 1983), John White, Sydney Brenner e colaboradores descreveram a anatomia e todos os 302 neurônios no hermafrodita adulto (Shaye; Greenwald, 2011).

O sequenciamento do genoma do *C. elegans* e experimentos de RNA de interferência (RNAi) levaram Sydney Brenner e John Sulston à conquista do Prêmio Nobel de 2002 de medicina, pela descoberta dos genes envolvidos no desenvolvimento desse organismo. Essas descobertas ajudaram a identificar genes com funções semelhantes entre os nematoides e outros animais, e os seres humanos. Um exemplo, é o gene regulador de apoptose Bcl-2 dos vertebrados com igual função ao gene ced-9 do *C. elegans* (Hengartner; Horvitz, 1994). Descobertas subsequentes foram feitas utilizando esse modelo como, por exemplo, as vias

de sinalização da apoptose, a clonagem de genes, o silenciamento de genes por RNAi e o desenvolvimento da Green Fluorescent Protein (GFP) como marcador biológico (Chalfie *et al.*, 1994).

O *C. elegans* é um nematoide de vida livre, transparente, com dimensões de 0,25 mm no estado larval e 1 mm de comprimento para os vermes adultos. Seu pequeno tamanho permite a sua visualização em microscópio de dissecação, utilizado para conhecer seus movimentos, alimentação, desenvolvimento, cópula e postura de ovos. A transparência dos vermes permite diferenciar os detalhes subcelulares utilizando fluorescência para marcar proteínas e compartimentos subcelulares. Além disso, proteínas como a GFP também permitem o estudo do processo de desenvolvimento, enzimas e vias celulares como aquelas envolvidas no envelhecimento e estresse oxidativo (Corsi; Wightman; Chalfie, 2015).

A linhagem selvagem apresenta a forma hermafrodita e macho. Os hermafroditas são fêmeas que produzem esperma antes da produção de oócitos e geram uma progênie de aproximadamente 300 vermes, sendo que apenas 0,1 a 0,2 % são machos. A diferenciação entre os sexos está na presença de dois cromossomos X no hermafrodita e um cromossomo X no macho (Zarkower, 2006). A autofertilização dos hermafroditas simplifica a manutenção do estoque animal e a progênie é levada à homozigidade. A importância dos machos está na produção de animais com diferentes composições genéticas (Ward; Carrel, 1979).

É possível enumerar muitas vantagens na utilização do *C. elegans* como um modelo biológico eucarioto. Entre elas, estão baixo custo de manutenção, fácil cultivo em laboratório por ser mantido em placas de ágar recoberto por uma camada de *Escherichia coli* como fonte de alimento e, devido ao seu pequeno tamanho, permite manter um grande número de modelos em espaço físico reduzido. Seu ciclo de vida é curto, aproximadamente 3 dias a 20 °C, os adultos hermafroditas geram uma progênie de mais de 300 vermes (Sulston *et al.*, 1983), permite a criopreservação e, sob condições adversas, pode permanecer em estado Dauer por até 3 meses sem se alimentar. Sua transparência possibilita o estudo do seu desenvolvimento e também as mutações ocorridas.

Em contraste com os parasitas obrigatórios, os nematoides podem ser cultivados na ausência de um hospedeiro e são benignos aos humanos (Nigon; Félix, 2017). De fácil manipulação genética, contribui para a utilização de técnicas conhecidas, como genética reversa na obtenção de linhagens mutantes. Essas linhagens são utilizadas no estudo dos genes mutantes, superexpressão ectópica de genes, expressão de proteínas alvo, e ainda o

estudo da estrutura e função de domínios de proteínas e analisar elementos regulatórios de DNA e RNA (Corsi; Wightman; Chalfie, 2015). Além disso, 40 % dos genes associados com doenças humanas possuem um gene ortólogo ao genoma do *C. elegans* e, por esta razão, tem sido utilizado como modelo para o estudo de doenças humanas como Alzheimer, Parkinson, diabetes, distrofia muscular de Duchenne e câncer (O'Reilly *et al.*, 2013).

2.6 PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA

As doenças infecciosas bacterianas se apresentam como um sério problema de saúde pública devido ao aumento da resistência bacteriana e ainda a diminuição da eficácia das drogas utilizadas para o tratamento de patologias causadas por microrganismos (Hemaiswarya; Kruthiventi; Doble, 2008). Produtos naturais têm sido utilizados no tratamento de doenças infecciosas desde a antiguidade e ainda proporcionam pistas para o desenvolvimento de drogas utilizadas na atualidade. Pesquisas dos produtos naturais podem trazer a descoberta de fontes de novos agentes antimicrobianos mais eficazes na multiplicidade de doenças existentes (Newman; Cragg, 2012).

As benzoquinonas e hidroxibenzoquinonas são metabólitos secundários que têm desempenhado importante papel de defesa como um resultado de sua efetividade na inibição do crescimento bacteriano, fúngico, parasitário e promovendo a atividade antimicrobiana pela inibição da síntese de DNA (Kersten, 1971, p. 48).

Kim e colaboradores (2010), avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato do gérmen de trigo *Triticum vulgare*, que apresenta como substância majoritária a 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone, utilizando padrões de 1,4-benzoquinona, hidroquinona, metoxibenzoquinona e 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone contra as espécies bacterianas *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* KCTC2054, e *Bacillus cereus*. Os resultados mostraram uma potente atividade antimicrobiana da 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone contra *S. aureus* e *S. typhimurium*. A atividade ainda se mostrou maior do que do antibiótico de referência cloranfenicol. Outro achado foi a relação estrutura-atividade das substâncias avaliadas. Enquanto a 1,4-benzoquinona apresentou atividade antimicrobiana contra todas as bactérias avaliadas, as metoxibenzoquinona e 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (benzoquinonas metoxiladas) apresentaram maior atividade contra *S. aureus* e *S. typhimurium* KCTC2054.

As benzoquinonas rapanona e embelina foram isoladas das espécies *R. umbellata* (Ogawa; Natori, 1968; Bauer *et al.*, 1973; Amaro-Luis, 2008; Da Costa *et al.*, 2014;) e *R. guianensis* Aubl det. Wordsct ; sendo que, neste último estudo, verificou-se que embelina e rapanona apresentaram atividades antimicrobiana frente a algumas espécies de bactérias Gram (+), Gram (-) e os fungos *Candida albicans* e *Aspergillus niger* (Reguero; Calle; Mata, 1989).

O estudo da atividade antimicrobiana de biomoléculas da classe das benzoquinonas e hidroxibenzoquinonas vem se ampliando nos últimos anos com o intuito da descoberta de novas estruturas químicas com potencial uso na indústria farmacêutica. O interesse cresce ainda mais, devido ao aumento de resistência bacteriana e a diminuição da eficácia das drogas utilizadas para o tratamento de patologias causadas por microrganismos (Macias *et al.*, 2008).

Espécies do gênero *Myrsine* têm sido utilizadas na medicina popular para o tratamento de afecções urinárias, cujos metabólitos, derivados de benzoquinonas têm apresentado comprovada ação antimicrobiana (Ohtani *et al.*, 1993; Amenia *et al.*, 2016).

3 JUSTIFICATIVA

Na medicina popular, grupos étnicos utilizam as entrecascas da espécie *Myrsine leuconeura* L. como tratamento fitoterápico de cólicas renais, calculose renal e infecções urinárias bacterianas. No entanto, até o momento, não há relatos de estudos químicos e biológicos de entrecascas de *M. leuconeura*. Assim, a investigação da composição química e das atividades antioxidante e antibacteriana de entrecascas da espécie *M. leuconeura* irá trazer informações imprescindíveis para assegurar a qualidade dos medicamentos fitoterápicos produzidos com a espécie alvo.

4 HIPÓTESE

Entrecascas de *Myrsine leuconeura* L. são fontes promissoras de derivados de 1,4-hidróxibenzoquinonas com propriedades antioxidante e antimicrobiana.

5 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo isolar e purificar derivados de 1,4-hidroxibenzoquinonas a partir de extrato hidroalcolico, obtido das entrecascas da espécie *Myrsine leuconeura*. Investigou-se também as atividades antioxidante e antimicrobiana da fração obtida e substâncias isoladas, e a toxicidade destas, na sobrevivência de *Caenorhabditis elegans*.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar e identificar derivados de 1,4-hidroxibenzoquinonas presentes nas entrecascas de *M. leuconeura*;
- b) Avaliar o efeito antioxidante da fração acetato de etila e substância (s) isolada (s) de *M. leuconeura*;
- c) Avaliar a toxicidade da fração acetato de etila e substância (s) isolada (s) de *M. leuconeura*, utilizando o modelo *Caenorhabditis elegans*;
- d) Avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) da fração acetato de etila e substância (s) isolada (s) de *M. leuconeura*.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Entrecascas de *M. leuconeura* foram coletadas na Fazenda Santa Maria em Sacramento/MG e uma exsicata está depositada no Herbário de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP (voucher HPMU-3079). A atividade de acesso ao Patrimônio Genético foi cadastrada no SisGen (nº do cadastro A093CD8).

6.2 OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO

Após serem estabilizadas em estufa de ar circulante à temperatura de 40 °C, entrecascas do material vegetal coletado foram pulverizadas em moinho de faca. O pó seco (m=190,0 g) passou pelo processo de maceração exaustiva, à temperatura ambiente, utilizando-se etanol: água 70 % como solvente extrator. Em seguida, o solvente orgânico foi removido, em rotaevaporador, sob pressão reduzida, resultando no extrato bruto hidroalcoólico das entrecascas de *M. leuconeura* EML (m=55,0 g).

O extrato hidroalcoólico de *M. leuconeura* EML foi ressuspenso com solução metanol (MeOH) e água (H₂O) na proporção de 1:1 sendo, em seguida, realizada uma partição com hexano e acetato de etila, resultando nas frações Hex (m=18,10 g), AcOEt (m=29,72 g), e Aq (m=3,0 g).

6.3 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA - ML/AcOET

Aproximadamente 30 g da fração acetato de etila foi fracionada em coluna cromatográfica (CC), com diâmetro de 3,5 cm e 22 cm de altura, utilizando sílica gel como adsorvente, sendo recolhidas frações, com solventes em ordem crescente de polaridade, nas seguintes proporções: hexano, hexano:AcOEt (98:2-3:7), AcOEt, AcOEt:MeOH (8:2-5:5) e MeOH.

Foram recolhidas 42 subfrações de 150 mL, as quais foram concentradas em rotaevaporador e, em seguida, analisadas em cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizando sílica gel 60 F₂₅₄ como fase estacionária e hexano:acetato de etila (8:2)

como eluente. Após eluição, as placas foram visualizadas em luz UV, reveladas com vanilina sulfúrica (Da Costa *et al.*, 2014), e as frações que apresentaram o mesmo perfil cromatográfico foram reunidas, resultando em 17 sub-frações (A-Q).

Para a análise das classes das subfrações as mesmas foram solubilizadas em metanol, filtradas e analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Ultravioleta – CLAE-UV, de acordo com a metodologia descrita por Baccarin *et al.* (2011). Para tanto, utilizou-se equipamento Shimadzu -SPD 20A, acoplado a um detector de arranjo de diodo. As amostras analisadas foram preparadas na concentração de 1mg/mL em metanol. A análise cromatográfica foi desenvolvida em coluna Luna C18 (250x4.6x5µm- tamanho da partícula) (Phenomenex, Macclesfield, UK). A fase móvel foi constituída de acetonitrila-metanol-água (48:30:22, v/v/v), em condição isocrática. O volume de injeção das amostras foi de 20µL e o fluxo 0,7 mL/min. As análises foram monitoradas em $\lambda=230\text{nm}$ e $\lambda=270\text{nm}$.

6.3.1 Purificação das Subfrações N e P

As subfrações N (12,3 mg) e P (54,1 mg), foram fracionadas, separadamente, em CC, utilizando sílica gel como adsorvente e hexano:ACOEt (98:2) como fase móvel. As frações recolhidas (40 mL) foram analisadas em cromatografia em CCDC, utilizando sílica gel 60 F₂₅₄ como fase estacionária, hexano:acetato de etila (8:2) como eluente e reveladas com luz UV, seguido de vanilina sulfúrica. Após a análise das placas cromatográficas, as frações que apresentaram semelhança na cromatoplaça foram reunidas, resultando em 3 subfrações RA-RC.

6.3.2 Purificação da Subfração RC

A subfração RC (m=42,2 mg) foi recromatografada em CC, utilizando sílica gel 60 como adsorvente. Nesta etapa da obtenção, a coluna cromatográfica foi eluída, primeiramente, com 300 mL de Hex:ACOEt (9:1) e a fração recolhida foi evaporada, resultando na purificação da amostra R1 (m=10,1 mg). Em seguida, a coluna cromatográfica foi eluída com 300 mL de Hex:ACOEt (8:2) e a subfração recolhida foi evaporada, resultando na amostra denominada R2 (m=20,3 mg).

6.4 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL

As substâncias isoladas, presentes nas amostras R1 e R2 foram submetidas à análise por espectroscopia de Infravermelho (IV), espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H), e Carbono 13 (RMN de ^{13}C), Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC), Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC), e Espectrometria de Massas de Alta Resolução, com Ionização por *Electrospray* (ESI-EM). As análises foram realizadas nos equipamentos infravermelho-FT Nicolet, RMN Bruker DRX-400 e DRX-500, e espectrômetro de massas quadrupolo tandem Xevo[®] TQ-S (Waters Corporation, Milford, MS, USA), no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FFCLRP/USP).

6.5 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM).

6.5.1 Análise de Fração Acetato de Etila “ML/AcOEt por CG-EM

As análises em cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), da fração acetato de etila “ML/AcOEt” foi realizada em cromatógrafo de fase gasosa Shimadzu acoplado a espectrômetro de massas, modelo QP2010, equipado com injetor automático AOC-20i. A coluna utilizada foi: coluna capilar DB-5MS, com 30m de comprimento, por 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de fase estacionária. As condições de análise foram: temperatura do injetor: 260 $^{\circ}\text{C}$; temperatura do detector: 230 $^{\circ}\text{C}$; impacto de elétrons: 70 eV; gás de arraste: He; fluxo: 1,0 mL/min.; split: 1/20; programa de temperatura: 60 – 310 $^{\circ}\text{C}$, 7 $^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$; volume de injeção: 1 μL de solução. A identificação das substâncias foi realizada através da comparação dos seus espectros de massas com o banco de espectros presentes nas bibliotecas Wiley 7, Nist 12, Nist 62. Somente foram identificados os constituintes que apresentaram similaridade acima de 90 % com as bibliotecas mencionadas.

6.5.2 Análise das Amostras R1 e R2

As análises em cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas

(CG-EM), das amostras R1 e R2 foram realizadas em cromatógrafo de fase gasosa Varian 3900 acoplado a espectrômetro de massas, modelo Saturn 2100T, equipado com injetor automático CP 8410. A coluna utilizada foi: coluna capilar DB-5MS, com 30m de comprimento, por 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de fase estacionária. As condições de análise foram: temperatura do injetor: 260 °C; temperatura do detector: 230 °C; impacto de elétrons: 70 eV; gás de arraste: He; fluxo: 1,0 mL/min.; split: 1/20; programa de temperatura: 60 – 310 °C, 7 °C/minuto; volume de injeção: 1 µL de solução.

6.6 ENSAIO ANTIOXIDANTE *IN VITRO*: DPPH•

A fração acetato de etila ML/AcOEt e a rapanona obtidas do extrato hidroalcoólico de *M. leuconeura* (EML) foram avaliadas frente à capacidade dos possíveis antioxidantes presentes, em sequestrar o radical estável DPPH•.

Para a análise da atividade antioxidante foi preparada uma solução de DPPH 0,004 % (p/v) em metanol e soluções da fração acetato de etila ML/AcOEt nas concentrações 2,0 a 9,0 µg/mL e de rapanona nas concentrações 25 a 200,0 µg/mL. O teste foi realizado em triplicata e cada amostra foi incubada utilizando 50 µL da solução do extrato acrescida de 950 µL da solução de DPPH por 15 minutos a 30 °C em ausência de luz. Em seguida, foram lidas as absorbâncias das soluções em espectrofotômetro de ultravioleta (UV) em comprimento de onda de 517 nm. Para o controle positivo foi utilizada o padrão rutina em concentrações entre 0,98 a 15,6 µg/mL (50 µL rutina + 950 µL DPPH) a partir de solução a 0,004 % (p/v) em metanol. As porcentagens das taxas de inibição das concentrações foram calculadas utilizando os valores obtidos das absorbâncias das amostras e da solução branco (50 µL metanol + 950 µL DPPH). A porcentagem de inibição corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante e foi medida por meio da fórmula 1:

Fórmula 1: cálculo da porcentagem de inibição

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\text{Abs do branco} - \text{Abs da amostra}}{\text{Abs do branco}} \times 100$$

A concentração inibitória (IC₅₀) refere-se à mínima concentração de antioxidante necessária para inibir uma determinada concentração de radical em 50 %. Através de uma curva de regressão linear, utilizando os valores das concentrações da amostra e % inibição,

foi determinada a equação da reta e essa, utilizada para o cálculo da IC₅₀ utilizando a fórmula 2, dado em mg/L (Kirschweng *et al.*, 2017).

Fórmula 2: cálculo da concentração inibitória (IC₅₀)

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{a}$$

Onde:

b = Interseção do eixo y

a = Inclinação da reta

As análises foram realizadas em triplicata e o delineamento adotado foi o inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos a ANOVA com auxílio do programa SISVAR V.4.3 (Ferreira, 2003), sendo as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Scott; Knott, 1974).

6.6 ENSAIO DE TOXICIDADE NO MODELO IN VIVO *Caenorhabditis elegans*

6.6.1 Linhagem e Manutenção de *C. elegans*

Foi utilizada neste trabalho a cepa do tipo selvagem de *C. elegans* (N2). Esta cepa foi gentilmente cedida pelo LaMaBio (Laboratório de Métodos Alternativos de Bioprodutos) coordenado pela Prof^a. Dr^a. Ana Marisa Fusco Almeida do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara, onde foi realizado o ensaio de toxicidade.

As cepas foram mantidas em placas de Petri contendo o meio sólido Nematode Growth Medium (NGM) semeadas com *Escherichia coli* OP50 e mantidas a 20 °C. Para o experimento, foram preparadas subculturas em novas placas e deixadas em incubação por 72 h. Após esse intervalo, foi observado o crescimento dos nematoides gravídicos em microscópio óptico invertido com lentes objetivas 40X.

Para o preparo do meio NGM, foram pesados 3 g de NaCl, 17 g de ágar, 2,5 g de peptona e adicionados de 975 mL de água destilada. A solução obtida foi esterilizada por vapor úmido a 120 °C por 15 min. Após resfriamento até 55 °C foram adicionados 1 mL de CaCl₂ 1M, 1 mL de colesterol em etanol 5 mg/mL, 1 mL de MgSO₄ 1M e 25 mL de tampão

K_2HPO_4 1M em pH 6,0. Após a homogeneização o meio foi distribuído em placas de Petri e armazenados em temperatura de 2 a 8 °C (Stiernagle, 2006).

6.6.2 Isolamento e Cultivo de *E. coli*

A linhagem de bactéria *E. coli* OP50 foi utilizada como fonte de alimento para os nematoides *C. elegans* (Brenner, 1974). A bactéria foi inoculada em 5 mL de caldo Luria Broth (LB) e incubada durante 18h a 37 °C. Em seguida, o volume total foi aliquoteado em microtubos e mantidos refrigerados a 4 °C. O caldo LB foi preparado utilizando-se 10 g de triptona, 5 g de Bacto™ Yeast Extract, 5 g de NaCl e adicionado água destilada q.s.p para 1 L. O caldo LB foi esterilizado por calor úmido sob pressão em autoclave a 121 °C durante 15 min (Stiernagle, 2006).

O meio de cultura LB ágar foi utilizado para manutenção e cultivo de *E. coli* OP50. Após a sementeira da bactéria, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C para crescimento e, em seguida, armazenadas em temperatura de 2 a 8 °C. Para o preparo do meio, foram pesados 10 g de triptona, 5 g de Bacto™ Yeast Extract, 5 g de NaCl e adicionados ao Erlenmeyer contendo 1L de água destilada. Após a homogeneização, a solução foi corrigida para pH de 7,5. Após resfriamento o meio foi distribuído em placas de Petri, em fluxo laminar, até completa geleificação e, em seguida, as placas foram armazenadas em temperatura de 2 a 8 °C (Porta-de-la-Riva *et al.*, 2012).

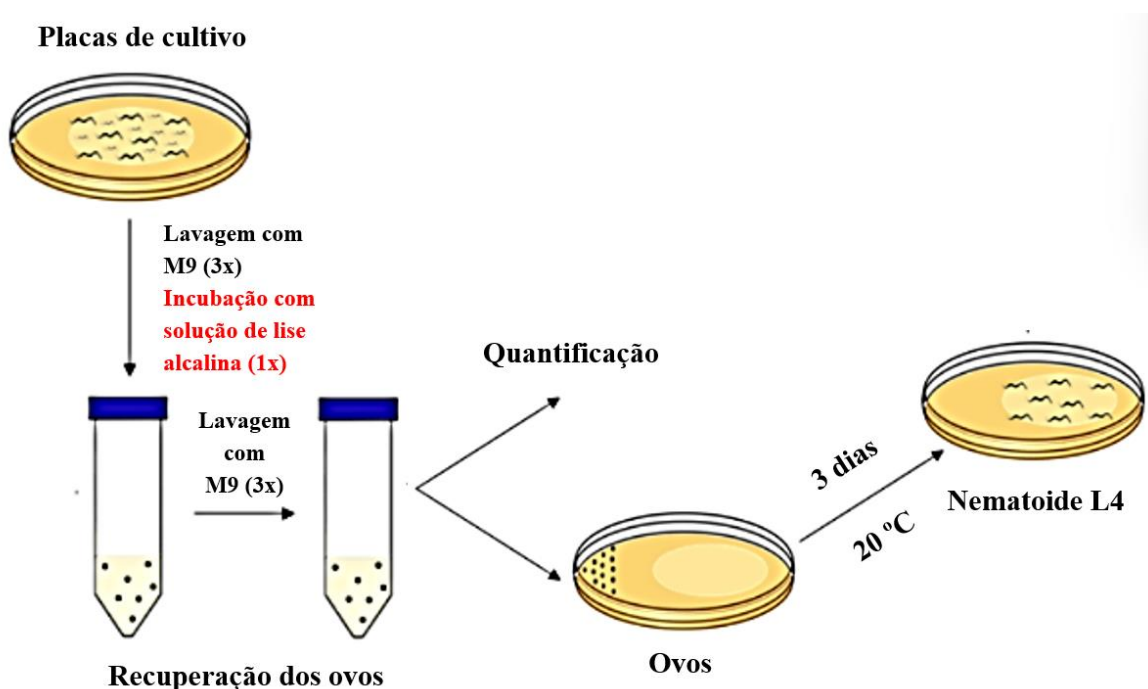
6.6.3 Sincronização

Para a realização do ensaio de toxicidade, os nematoides foram sincronizados, afim de garantir toda a população o mesmo estágio larval (L4) (Brenner, 1974). O tampão M9 utilizado no procedimento é composto por $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 0,25 g/L, NaCl 5 g/L, Na_2HPO_4 6 g/L, KH_2PO_4 3 g/L e água destilada q.s.p. O meio foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos e mantido sob refrigeração de 2 a 8 °C (Porta-de-la-Riva *et al.*, 2012).

Após a realização de subculturas descrita no item 6.6.1, os vermes hermafroditas adultos (grávidos) foram coletados das placas com solução estéril do tampão M9 e transferidos para tubos cônicos de 15 mL. Os tubos foram acrescidos de 5 mL de solução contendo 5 M de NaOH e 5 % NaCl (3:1) e submetido a agitação vigorosa durante 5 min., para lise e descontaminação. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 400 xg por 1 min. e

o sobrenadante descartado. Para a lavagem do pellet e remoção das bactérias, o conteúdo foi lavado 3 vezes com 5 mL de tampão M9, centrifugado a 400 xg por 2 min. e descartado o sobrenadante. Os ovos foram transferidos para uma extremidade sem alimento da placa de cultura NGM semeada na região oposta com *E. coli* OP50. Em seguida, as placas foram incubadas a 20 °C e acompanhada a eclosão das larvas L1. Estas migraram para a região contendo a fonte de alimento bacteriana, separando-se dos restos dos nematoides mortos. Desta forma, após três dias do procedimento de lise alcalina, foram obtidos nematoides sincronizados no estágio L4 (figura 2) (Porta-de-la-Riva *et al.*, 2012).

Figura 2: Esquema da sincronização para obtenção de ovos e nematoides no estágio L4



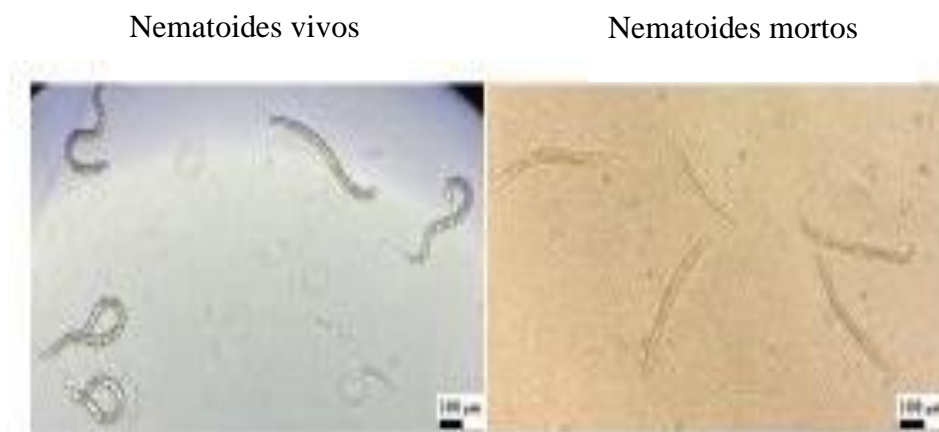
Fonte: Adaptado de Albuquerque, (2019).

6.6.4 Ensaio de Toxicidade

Após a etapa de sincronização para obtenção dos adultos jovens no estágio L4, cerca de 20 larvas foram transferidas para cada poço de placas de 96 poços contendo 100 µL de um meio composto por 60 % de meio M9; 40 % de caldo BHI; 10 µg/mL de colesterol em etanol; 200 µg/mL de ampicilina e 90 µg/mL de canamicina. Em seguida, foram adicionados 100 µL de diluições da fração e da substância isolada, obtendo concentrações finais em cada poço variando de 200, 150, 100, 80, 60 e 40 µg /mL. As placas foram incubadas a 25 °C por

24 h. A sobrevivência foi avaliada pela mobilidade e forma do nematoide (larvas em forma de vara foram consideradas mortas, enquanto larvas sinusoidais foram consideradas vivas, conforme Figura 3, em microscópio óptico invertido em lentes objetivas 40X (Scorzoni *et al.*, 2013; Medina-Alarcón *et al.*, 2017; Abdullah *et al.*, 2019; Costa-Orlandi *et al.*, 2020).

Figura 3: Aparência visual dos nematoides no teste de toxicidade



Fonte: LaMaBio (Laboratório de Métodos Alternativos de Bioprodutos - Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara).

As análises foram realizadas em triplicata e o delineamento adotado foi o inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos a ANOVA com auxílio do programa SISVAR V.4.3 (Ferreira, 2003), sendo as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (Scott; Knott, 1974).

6.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERIANA

6.7.1 Espécies Bacterianas

O potencial antimicrobiano foi avaliado frente as espécies bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas pertencentes ao Laboratório de Biologia Molecular do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da UNAERP: *Campylobacter jejuni* (ATCC 33291), *Clostridium perfringens* (ATCC 13124), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella enterica* (ATCC 9184) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). E ainda, as espécies bacterianas pertencentes à coleção do Prof. Dr. André Pitondo da Silva, situada no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular da

UNAERP: *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Klebsiella pneumoniae* Pandroga Resistente (PDR)(Kp 177), *Enterococcus faecium* (ATCC 4083) e *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) . As bactérias estavam criopreservadas a - 80 °C em criotubos contendo meio de cultura liquido BHI (Brain Heart Infusion) (Oxoid, Reino Unido) acrescido de glicerol 15 % . As linhagens foram cultivadas nos meios de cultura descritos na Tabela 2.

Tabela 2- Meios de cultura utilizados para cultivo dos micro-organismos e da atividade antimicrobiana.

Microrganismos	Meio para o cultivo	Meio para atividade antimicrobiana	Temperatura °C
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	Mueller-Hinton	Mueller-Hinton	37°
<i>C. jejuni</i> ATCC 33291	TSA (Typticase soy agar) com 7% soro de carneiro	Mueller-Hinton II	42°
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	RCM (Meio Reforçado para Clostridium)	Mueller-Hinton II	37°
<i>E. faecium</i> ATCC 4083	Mueller-Hinton	Mueller-Hinton	37°
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	Mueller-Hinton	Mueller-Hinton	37°
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Mueller-Hinton	Mueller-Hinton	37°
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	Mueller-Hinton	Mueller-Hinton	37°
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Mueller-Hinton	Mueller-Hinton	37°
<i>K. pneumoniae</i> PDR Kp 177	Mueller-Hinton	Mueller-Hinton	37°
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Mueller-Hinton	Mueller-Hinton	37°
<i>S. enterica</i> ATCC 9184	Mueller-Hinton II (modificado)	Mueller-Hinton II	37°

Fonte: a autora.

6.7.2 Determinação da Concentração Inibitória e Bactericida Mínima da Fração Acetato e Substância Isolada de *M. leuconeura*

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em placas de 96 poços em caldo Mueller-Hinton e Mueller-Hinton II (modificado) líquido, conforme especificado na tabela 2, para cada microrganismo. Os ensaios foram realizados, segundo a preconização do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016), com adaptações, segundo descrito por Pitondo-Silva *et al.* (2016).

Na placa de 96 poços de fundo chato, a primeira coluna serviu como controle negativo e foram adicionados 100 µL do meio de cultura líquido Müller-Hinton (Oxoid, Reino Unido) para 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, totalizando um volume de 100 µL, para avaliar a viabilidade do crescimento bacteriano. Da segunda até a décima primeira coluna, foram feitas diluições seriadas no fator 2 com as soluções teste da fração acetato de etila e substância isolada de *M. leuconeura* utilizando como solvente a mistura de dimetilsulfóxido (DMSO) e Kolliphor®- BASF (Lauril Sulfato de Sódio) na proporção 1:1, com concentração máxima de 1,0 %. Desta forma, as suas concentrações iniciais foram reduzidas à metade, conforme a passagem da solução de uma coluna para a outra. A concentração inicial foi de 250 µL/mL, abrangendo uma faixa de concentrações de 250 a 0,325 µL/mL sendo que a concentração máxima avaliada foi de 250 µL/mL. Em seguida, foram acrescentados 10 µL do inóculo, sendo que, ao final do experimento, todos os poços da placa obtiveram o volume final de 100 µL.

Para obtenção do inóculo, foram feitas suspensões bacterianas em solução salina esterilizada, a partir de culturas bacterianas recentes, 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 (5×10^7 UFC mL⁻¹).

A leitura das placas foi realizada após incubação por 18 horas em estufa bacteriológica a 37 °C. A leitura foi realizada visualmente observando-se a turvação ou não do meio de cultura, indicando a presença ou ausência de crescimento bacteriano, respectivamente. 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. Para os produtos que obtiveram valores $< 10 \mu\text{g/mL}$ da CIM, consideramos atividade antibacteriana significativa, moderada para os valores entre $10- 100 \mu\text{g/mL}$ e baixa para valores de CIM acima de $100 \mu\text{g/mL}$, como proposto por Omosa *et al.*, (2016).

Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), foram levadas em consideração as leituras referentes aos valores de CIM obtidas para cada linhagem bacteriana frente a cada solução testada. Portanto, após a realização da leitura das placas, foram selecionados para os testes de CBM todos aqueles poços com ausência de crescimento bacteriano visível, além do poço controle negativo e controle positivo. Para a realização do experimento foram retiradas alíquotas de $10 \mu\text{L}$ de cada poço selecionado e transferidas para placas de 96 poços contendo caldo Muller Hinton (Oxoid, Reino Unido) com a devida identificação de diluição do produto testado e a respectiva linhagem bacteriana, para posterior determinação da CBM. As placas foram incubadas por 24 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e, após este período, foi realizada a primeira avaliação visual para determinação da CBM pela presença ou ausência de turvação do meio de cultura. Foi considerada como concentração bactericida mínima a menor concentração da solução para a qual não houve turvação do meio de cultura no poço.

Após realizada a primeira leitura, foram aplicados $30 \mu\text{L}$ do revelador resazurina (0,02%) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) em todos os poços da placa. Em seguida, as placas foram incubadas novamente, 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 (Figura 2). 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. Todos os testes foram realizados em triplicata.

7 RESULTADOS

7.1 OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO

Após a pulverização do material vegetal uma massa de pó seco igual a 190,0 g. Do processo de maceração resultou no extrato bruto hidroalcoólico das entrecascas de *M. leuconera* EML com uma massa de 55,0 g.

Do processo de fracionamento do extrato bruto foram obtidas as frações Hex (m=18,10 g), AcOEt (m=29,72 g), e Aq (m=3,0 g). Do fracionamento da fração acetato de etila em CC foram recolhidas 42 subfrações que foram analisadas em CCDC resultando nas subfrações de A-Q de mesmo perfil cromatográfico. Esse perfil observado, juntamente com as informações a respeito da classe dos constituintes químicos produzidos em espécies de *Myrsine* (Da Costa *et al.*, 2014), levou-nos a investigar se a substâncias presentes nas subfrações A-Q eram da classe das alquilbenzoquinonas.

De acordo com os dados obtidos, foi possível verificar que as subfrações N e P apresentaram bandas de absorção nos comprimentos de onda entre $\lambda=200$ e $\lambda=300$ nm, indicando a presença de substância da classe de alquilbenzoquinonas (BACCARIN *et al.*, 2011). O ANEXO 1 mostra os cromatogramas e espectros de ultravioleta obtidos, após análise por CLAE-UV das subfrações N e P.

Após a purificação das subfrações N e P como descrito em 6.3.1 foram obtidas 3 subfrações semelhantes RA-RC. Da subfração RC (m=42,2 mg) resultou duas subfrações R1 (m=10,1 mg) e R2 (m=20,3 mg).

7.2 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS E PURIFICADOS

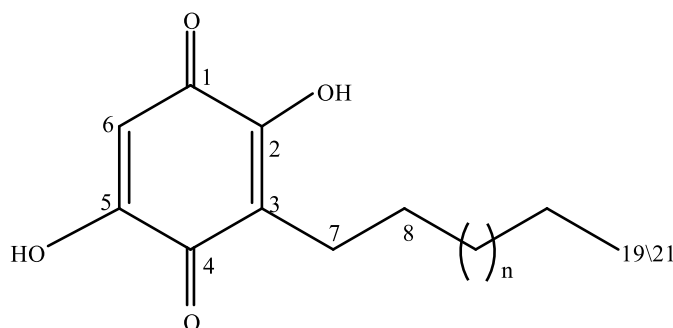
7.2.1 Identificação Estrutural das Amostras R1 e R2

Os espectros de infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e ^{13}C) e espectro de massas de alta resolução, obtido no modo negativo, com ionização por *electrospray* (IES-EM) das amostras R1 e R2 encontram-se nos ANEXOS 2 e 3, respectivamente.

7.2.1.1 Identificação estrutural das substâncias presentes na amostra R1

O espectro de RMN ^1H de R1 (500 MHz; DMSO- d_6) (ANEXO 2) apresentou sinais que foram atribuídos às substâncias rapanona 1 e suberonona 2; sendo um singlete em δ 5.76, integrando para 1 hidrogênio, atribuído ao H-6 da benzoquinona; um tripleto em δ 0.87 ($J=6.5$ Hz), integrando para 3 hidrogênios, atribuído ao grupamento metila terminal (C-19/C-21). Também foram identificados sinais referentes a grupos metilenos em δ 2.27; δ 1.34, integrando para 2 hidrogênios cada; os quais foram atribuídos aos hidrogênios H7 e H8 da cadeia carbônica lateral. O sinal em δ 1.22 foi atribuído aos hidrogênios metilênicos dos grupos de C9-C19 da rapanona (1) e dos grupos de C9-C21 da suberonona (2) (Figura 4). A identificação das substâncias foi realizada, após comparar os valores dos deslocamentos químicos obtidos com os dados da literatura (Da Costa *et al.*, 2014).

Figura 4: Estrutura molecular das substâncias Rapanona e Suberonona



Fonte: a autora.

Nota: Rapanona ($n=9$, R=OH); Suberonona ($n=11$)

A Tabela 3 mostra a atribuição dos carbonos aos respectivos hidrogênios, através das informações obtidas dos espectros de RMN ^{13}C e HSQC (ANEXO 2). O espectro de massas da amostra R1 adquirido em modo negativo (ANEXO 2), apresentou os íons m/z 321 e m/z 349, correspondentes às massas moleculares das substâncias rapanona e suberonona, com a perda de um átomo de hidrogênio.

Tabela 3: Dados espectrais da mistura das substâncias rapanona e suberonona.

Número do átomo	HSQC	
	δ_C (DMSO-d6)	δ_H (DMSO-d6)
C		
3	118.23	-
CH		
6	104.61	5.76 (s)
CH₂		
7	22.91	2.27 (t, 7.5)
8	28.40	1.34 (m)
9-16/9-18	29.51-29.81	1.22
17/19	32.11	1.22
18/20	22.83	1.22
CH₃		
19/21	14.77	0.85 (t, 6.5)

Fonte: a autora

Nota: RMN¹H e ¹³C obtidos em 500 MHz e 125MHz, respectivamente; Deslocamentos químicos (δ) estão em ppm e os valores de constante de acoplamento J em Hz estão entre parênteses. Os sinais foram atribuídos com base no experimento HSQC.

Após análise da amostra R1 por CG-EM, observou-se a presença de dois picos cromatográficos, nos tempos de retenção $t = 27,78$ min. e $t = 30,33$ min. (ANEXO 2), cujos espectros de massas apresentaram os valores do íon molecular m/z 322 e m/z 350, respectivamente, referentes às massas moleculares das substâncias rapanona e suberonona.

7.2.1.2 Identificação estrutural da substância presente na amostra R2

O espectro de RMN ¹H de R2 (500 MHz; CDCl₃) (ANEXO 3) apresentou sinais que foram atribuídos à substância isolada rapanona; sendo um singlete em δ 6.01, integrando para 1 hidrogênio, atribuído ao H-6 da benzoquinona; um tripleto em δ 0.87 ($J=6.5$ Hz), integrando para 3 hidrogênios, atribuído ao grupamento metila terminal (C-19). Também foram identificados sinais referentes a grupos metilenos em δ 2.44; δ 1.47, integrando para 2 hidrogênios cada; os quais foram atribuídos aos hidrogênios H7 e H8 da cadeia carbônica lateral. O sinal em δ 1.25 foi atribuído aos hidrogênios metilênicos dos grupos de C9-C19 da rapanona. Os dados obtidos nos espectros de RMN ¹³C e HSQC (ANEXO 3) da molécula identificada como rapanona estão de acordo com as informações obtidas na literatura (Da Costa *et al.*, 2014). O cromatograma obtido após análise da amostra R2 por CG-EM

apresentou um pico com tempo de retenção $t = 27,71$ min. (ANEXO 3). O espectro de massas referente à esta substância apresentou o íon m/z 322, correspondente à massa molecular da substância rapanona (2,5-dihidroxi-3-tridecilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona).

7.2.2 Análise da Fração Acetato de Etila ML/ACOEt por CG-EM.

Os resultados obtidos após análise da fração acetato de etila ML/ACOEt por CG-EM estão apresentados na Tabela 4 com os tempos de retenção, porcentagens relativas e a similaridade com a biblioteca das substâncias identificadas.

Tabela 4. Resultados da análise da fração acetato de etila ML/ACOEt por CG-EM

SUBSTÂNCIAS	Fração Acetato de Etila ML/ACOEt		
	TEMPO DE RETENÇÃO (min.)	PORCENTAGEM RELATIVA (%)	SIMILARIDADE COM A BIBLIOTECA (%)
Pirogalol	12,4	26,9	97
Floroglucinol	16,1	2,41	96
Ácido palmítico	21,7	0,57	91
Etil palmitato	22,2	0,53	91
Etil linoleato	24,4	0,64	92
Rapanona	27,4	61,2	Não há *

*Após comparação do espectro de massas da substância eluída em $t=27,4$ min., com o banco de espectros presentes nas bibliotecas Wiley 7, Nist 12, Nist 62., verificou-se que não há substâncias identificadas com índice de similaridade acima de 90%. Conforme descrito, anteriormente, a identificação da substância rapanona foi realizada com base nos dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , e espectro de massas de alta resolução (EM-ESI), obtido em modo negativo. Após análise por CG-EM, verificou-se que a fragmentação da molécula, presente no pico $t=27,4$ min., apresentou os picos com valores m/z 322 (pico do íon molecular) e m/z 154 (fragmento da molécula), confirmando a estrutura da molécula da rapanona.

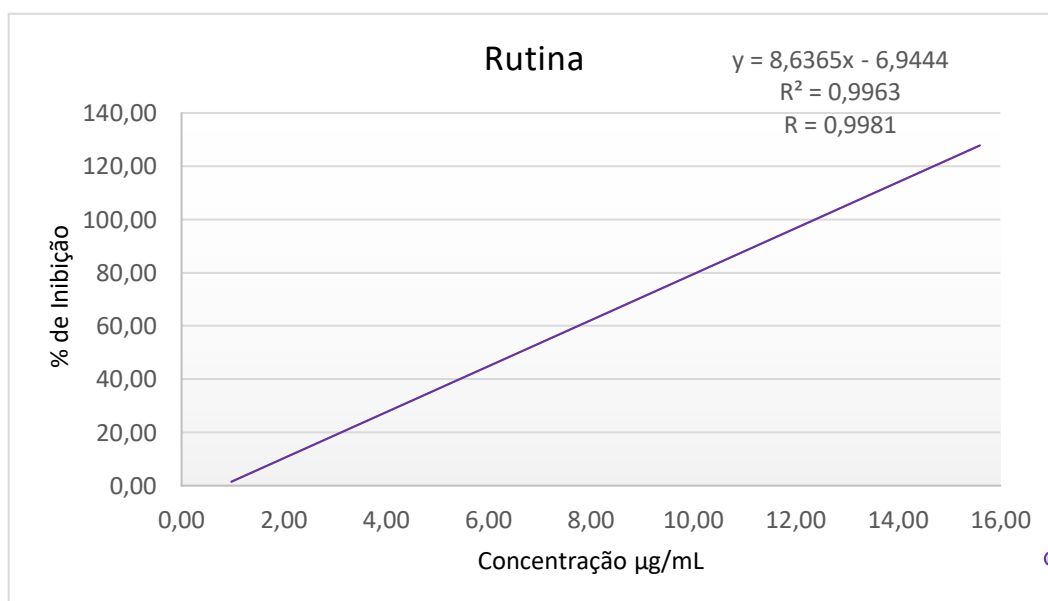
Após análise do cromatograma, foi possível observar a presença de um pico majoritário, no tempo de retenção $t = 27,415$ min. (ANEXO 4), cujo espectro de massas referente à esta substância mostrou o íon m/z 322, correspondente à massa molecular da substância rapanona. Também foram detectados picos cromatográficos com intensidades menores, identificados com índice de similaridade acima de 90% com as bibliotecas mencionadas, tais como: pirogalol, floroglucinol, ácido palmítico, etil palmitado e etil linoleato.

7.3 ENSAIO ANTIOXIDANTE POR REDUÇÃO DO RADICAL DPPH•

A atividade antioxidante da fração acetato de etila ML/AcOEt e da substância rapanona foi analisada de acordo com os valores de IC_{50} . Valores mais baixos indicam alta atividade antioxidante.

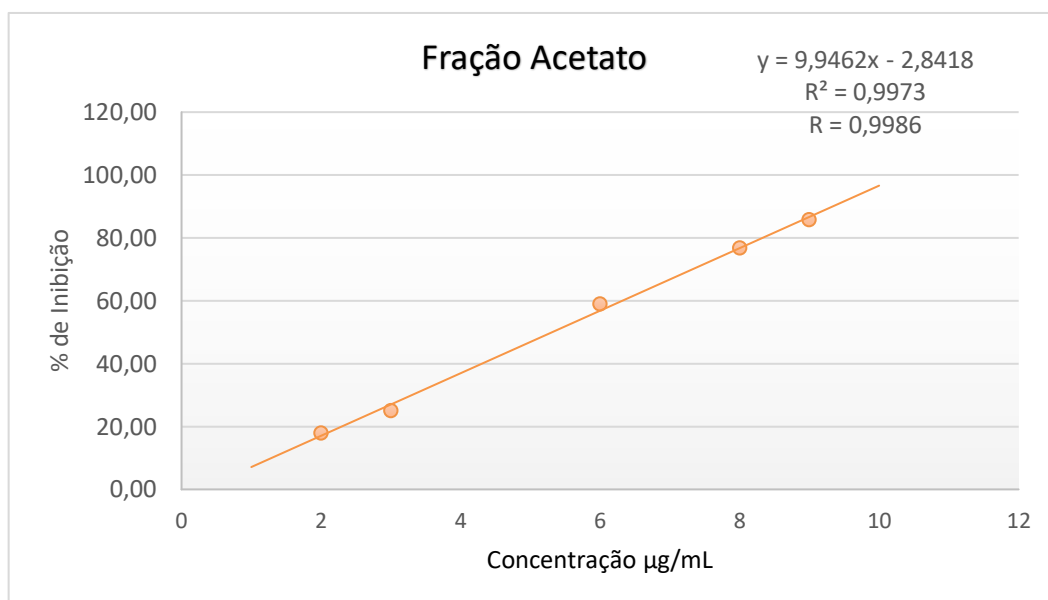
As análises demonstram que a atividade antioxidante da rutina, utilizada como padrão, foi determinada em IC_{50} 6,59 $\mu\text{g/mL}$, tendo sido ensaiadas concentrações de 0,98 a 15,6 $\mu\text{g/mL}$ com as respectivas porcentagens de inibição apresentadas no gráfico a seguir (Figura 5).

Figura 5: Curva padrão da rutina utilizada no ensaio de DPPH

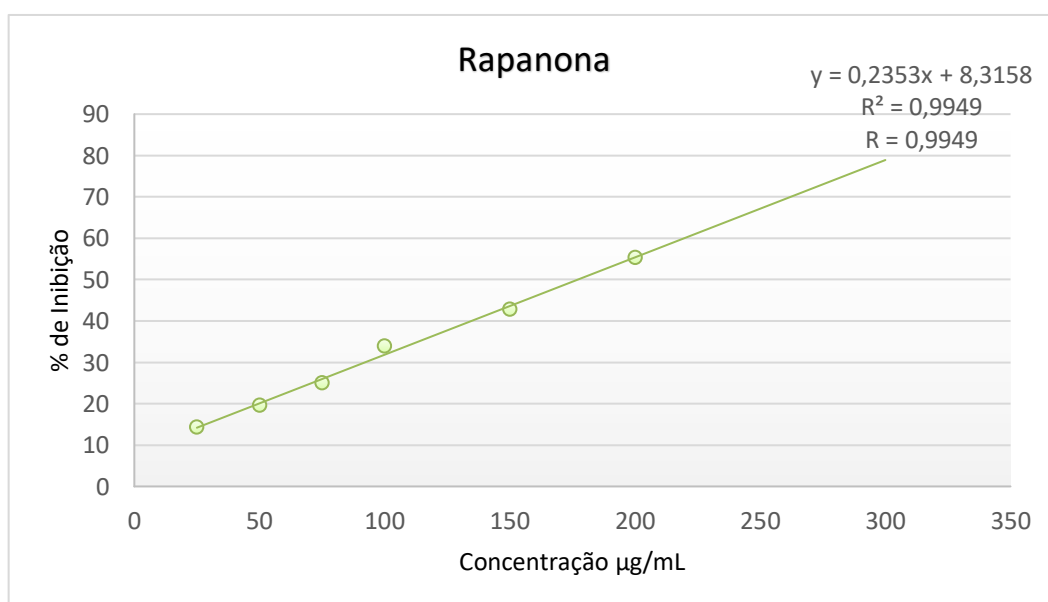


Fonte: a autora.

O valor de IC_{50} encontrado para a fração acetato de etila ML/AcOEt obtida do extrato hidroalcoólico de *M. leuconeura* foi igual a 5,31 $\mu\text{g/mL}$, tendo sido ensaiadas concentrações de 2 a 9,0 $\mu\text{g/mL}$, com as respectivas porcentagens de inibição apresentadas no gráfico a seguir (Figura 6).

Figura 6: Curva padrão da fração acetato utilizada no ensaio de DPPH

Fonte: a autora.

Figura 7: Curva padrão da rapanona utilizada no ensaio de DPPH

Fonte: a autora.

A atividade antioxidante da rapanona foi de 177,15 µg/mL determinada através das concentrações de 25 a 200,0 µg/mL com as suas respectivas porcentagens de inibição apresentadas no gráfico (Figura 7).

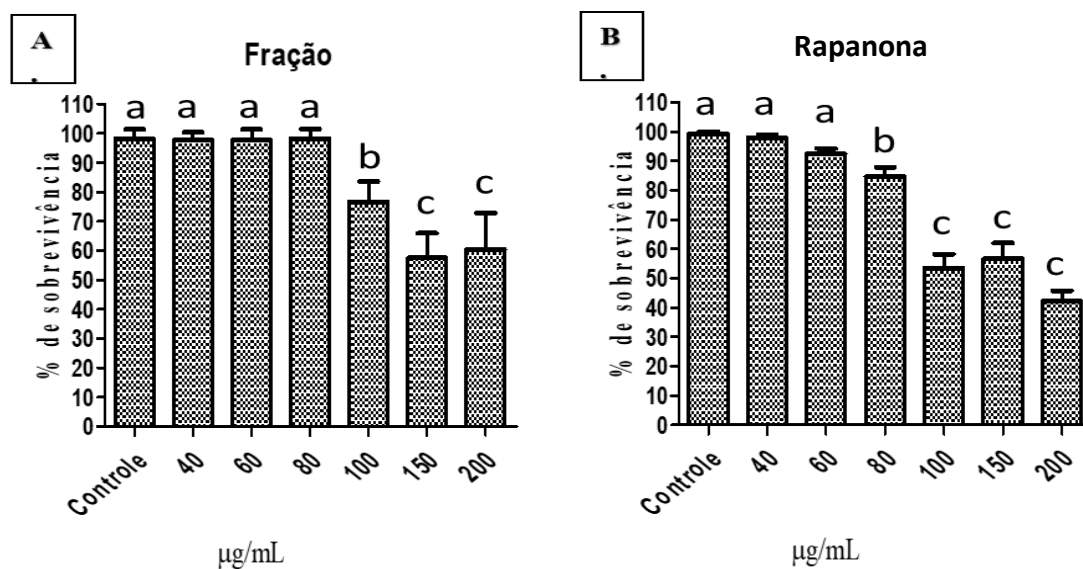
A fração acetato de etila ML/AcOEt mostrou melhor atividade antioxidante com valor de IC₅₀ igual a 5,31 µg/mL, enquanto a rapanona apresentou uma atividade baixa, com valor

de IC₅₀ igual a 177,15 µg/mL. Assim, a fração acetato apresentou atividade antioxidante 33 vezes superior ao composto rapanona isolado.

7.4 ENSAIO DE TOXICIDADE NO MODELO IN VIVO *Caenorhabditis elegans*

Os testes foram realizados em triplicata e, dois ensaios diferentes para a fração acetato e em um ensaio para a rapanona. Os resultados encontrados para a fração ML/AcOEt foram de 98,18 % (Figura 8) de sobrevivência para as concentrações 40 a 80 µg/mL com diminuição da sobrevivência a partir da concentração de 100 µg/mL (Figura 9) demonstrando uma possível toxicidade da fração avaliada. O resultado do teste para a rapanona foi 92,37 % (Figura 8) de sobrevivência para a concentração de 60 µg/mL com diminuição a partir de 80 µg/mL (Figura 10).

Figura 8. Ensaio de toxicidade com nematoides selvagens N2 estágio L4.

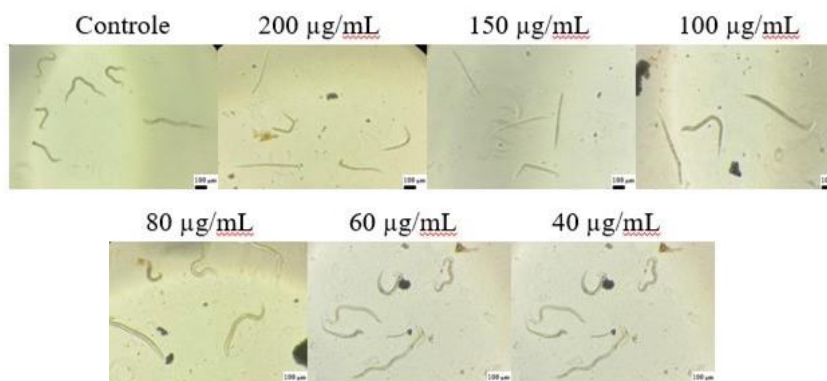


Fonte: a autora.

Nota: Ensaio de toxicidade com nematoides selvagens N2 tratados com fração acetato e substância rapanona em concentrações de 40 a 200 µg/mL. A sobrevivência foi avaliada pela mobilidade e forma do nematoide e realizada a contagem dos mesmos em comparação ao grupo controle, em microscópio óptico invertido em lentes objetivas 40X, como mostra a figura: (A) vermes tratados com fração acetato; (B) vermes tratados com a rapanona.

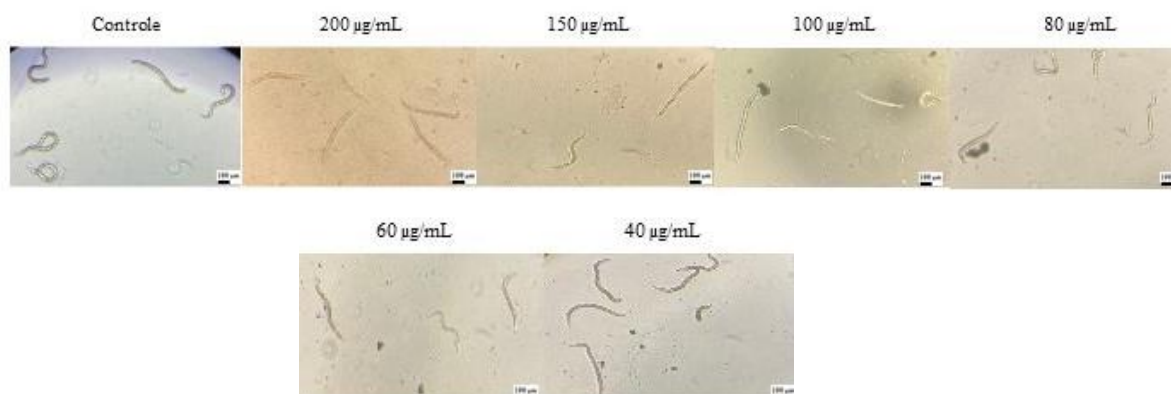
Médias seguidas de mesma letra, não diferem significativamente ($p > 0,05$) entre si, pelo teste de Scott-Knott 5% de significância.

Figura 9. *C. elegans* tratados com fração acetato de *Myrsine leuconeura*



Fonte: a autora.

Figura 10. *C. elegans* tratados com rapanona



Fonte: a autora.

Os resultados encontrados no ensaio de toxicidade apresentam as concentrações tóxicas para a fração ML/AcOEt e rapanona, além das concentrações ideais para a avaliação da ação antioxidante.

7.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os resultados foram organizados em tabela relacionando às substâncias com os valores obtidos de CIM em µg/mL (Tabela 5). A fração ML/AcOEt apresentou moderada atividade antimicrobiana ante *C. jejuni* ATCC 33291, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *S. enterica* ATCC 9184 (CIM 10 a 100 µg/mL). Para todas as outras linhagens, a fração ML/AcOEt apresentou atividade antimicrobiana baixa (CIM >100 µg/mL). A substância rapanona apresentou atividade antimicrobiana significativa para as

linhagens *E. faecium* ATCC 4083 e *S. aureus* ATCC 25923 (CIM < 10 µg/mL). Para as linhagens *C. jejuni* ATCC 33291, *C. perfringens* ATCC 13124, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 e *S. enterica* ATCC 9184, apresentou moderada atividade antimicrobiana (CIM 10 a 100 µg/mL) e, para as demais bactérias a atividade foi baixa (CIM > 100 µg/mL).

A atividade antimicrobiana da rapanona foi de 4 a 16 vezes superior à fração acetato para as linhagens susceptíveis a essas amostras analisadas.

As duas amostras avaliadas não apresentaram ação bactericida, sendo, portanto, bacteriostáticas, pois ocorreu a turvação dos meios para as concentrações analisadas, na determinação da CBM.

Tabela 5: Valores da concentração inibitória mínima (CIM, µg/mL) para as amostras avaliadas frente a cada linhagem bacteriana.

BACTÉRIAS	CIM (µg/mL)		
	FRAÇÃO ACETATO	RAPANONA	ANTIBIÓTICO REFERÊNCIA
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	n.d.	n.d.	≥ 15,52 ^c
<i>C. jejuni</i> ATCC 33291	62,5	15,6	0,12 ^a ; 0,06 ^b
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	250	31,25	0,06 ^a ; 0,12 ^b
<i>E. faecium</i> ATCC 4083	n.d.	3,125	≥ 7,76 ^c
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	n.d.	n.d.	≥ 15,52 ^c
<i>E. coli</i> ATCC 25922	62,5	15,6	0,48 ^{a e b}
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	62,5	15,6	0,48 ^a ; 0,97 ^b
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	n.d.	50,0	≥ 0,96 ^a
<i>K. pneumoniae</i> PDR Kp 177	n.d.	n.d.	≥ 100 ^{d*}
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	500	6,25	0,24 ^a ; 0,12 ^b
<i>S. enterica</i> ATCC 9184	62,5	15,6	0,24 ^a ; 0,12 ^b

Fonte: a autora.

Nota: ^a = ciprofloxacina; ^b = tigeciclina; ^c = ticarcilina; ^d = todos os antibióticos foram testados;

* = CAMPOS et al., 2018. n.d. = não definida nas concentrações analisadas.

8 DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou que a fração acetato de etila apresentou moderada atividade antimicrobiana ante *C. jejuni*, *S. enterica* (CIM de 62,5 $\mu\text{g/mL}$). Para todas as outras linhagens, esta fração acetato apresentou baixa atividade antimicrobiana (CIM >250 $\mu\text{g/mL}$). Já a substância isolada, rapanona, apresentou moderada atividade antimicrobiana (CIM de 15,6 à $\leq 31,25$ $\mu\text{g/mL}$) para as linhagens *C. jejuni*, *C. perfringens*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. entérica*, com ênfase para as linhagens que apresentaram significativa atividade *E. faecium* (CIM de 3,125 $\mu\text{g/mL}$) e *S. aureus* (CIM de 6,25 $\mu\text{g/mL}$). Para as demais bactérias a atividade foi baixa (CIM > 250 $\mu\text{g/mL}$).

Diante da diferença de atividade antimicrobiana apresentada pelo composto rapanona, que foi de 4 a 16 vezes superior à fração acetato para as linhagens susceptíveis a essas amostras analisadas, podemos atribuir essa atividade à 2,5-dihidroxi-3-tridecil benzoquinona presente no extrato de *Myrsine leuconeura*, que se encontra em menor quantidade na fração ML/AcOEt.

Estudo sobre a relação estrutura-atividade de um painel de 48 plantas quenianas contra fenótipos multidrogas resistentes (Omosa *et al.*, 2016), no qual foi identificada o composto rapanona, verificou-se a atividade antimicrobiana desta substância contra as bactérias gram-negativas *E. coli* mutante ΔacrAB de AG100; TET^R, devido ao gene *acrF* marcadamente superexpresso (AG100ATet), com valor de MIC de 16 $\mu\text{g/mL}$ e, *K. pneumoniae* KP55 multidroga resistente e, KP63 resistente à ampicilina, aztreonam e cefalotina, com valores de MIC de 32 e 16 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Para a bactéria Gram-positiva *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) 4, 6 e 8, os valores de MIC foram de 4, 32 e 64 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, alguns dos quais foram mais potentes que o cloranfenicol. Esses dados confirmam os resultados obtidos no presente estudo.

Observou-se também que não houve diferença de CIM (>250 $\mu\text{g/mL}$) contra as bactérias *A. baumannii*, *E. cloacae* e *K. pneumoniae* PDR. Os resultados podem ser explicados avaliando-se as características das bactérias testadas. *A. baumannii*, é um coccobacilo Gram-negativo, causador de infecções hospitalares respiratórias em pacientes entubados, além de infecções urinárias em pacientes cateterizados. Apresenta uma resistência intrínseca a diversos antimicrobianos, através de mecanismos como carbapenemases e β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), o que traz grandes desafios no tratamento dos pacientes (Wong *et al.*, 2017). *Enterobacter cloacae* é um bacilo Gram-

negativo que se destaca clinicamente como bactéria oportunista causadora de Infecções relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) principalmente, infecções envolvendo o trato urinário, trato respiratório baixo, pele e tecidos moles, feridas e sistema nervoso central (Lee *et al.*, 2010; Davin-Regli; Pagès, 2015). Apresenta perfil de resistência às cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações sugerindo o aumento das cepas produtoras de ESBLs (Tuon *et al.*, 2015). A *Klebsiella pneumoniae* multidroga-resistente é causadora de muitas infecções e está entre os patógenos causadores de infecções nosocomiais. Possui vários fatores de virulência e de resistência antimicrobiana, entre estes o gene de codificação das carbapenemases e β -lactamases de espectro estendido. Em particular, a *K. pneumoniae* testada é PDR, resistente a todos os antibióticos comercializados no Brasil. Todas essas bactérias apresentam importante perfil de resistência aos antimicrobianos e também à fração acetato de etila e substância rapanona avaliadas (Nakamura-Silva *et al.*, 2021).

Avaliada contra bactérias Gram-negativas, que tendem a apresentar maior resistência aos antimicrobianos do que as Gram-positivas por possuírem uma membrana externa que lhes proporciona uma camada de proteção maior e também bombas de efluxo (Epanand *et al.*, 2015), a substância rapanona apresentou forte atividade contra as Gram-positivas *E. faecium* (CIM de 3,125 μ g/mL) e *S. aureus* (CIM de 6,25 μ g/mL), boa atividade contra *C. perfringens* (CIM de 31,25 μ g/mL), também Gram-positiva, e boa atividade contra as Gram-negativas *C. jejuni*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. entérica*, (CIM de 15,6 à \leq 31,25 μ g/mL).

No ensaio antioxidante por redução do radical DPPH, a fração acetato de etila ML/AcOEt mostrou melhor atividade antioxidante com valor de IC₅₀ igual a 5,31 μ g/mL quando comparada ao padrão rutina com valor de IC₅₀ igual a 6,59 μ g/mL, enquanto a substância rapanona apresentou uma atividade menor, com valor de IC₅₀ igual a 177,15 μ g/mL. Quanto menor o valor de IC₅₀ maior a atividade antioxidante.

A rutina, um flavonol heterosídico derivado da quercetina com substituição na posição 3 (3-O-rutinosídeo-quercetina), é uma substância referência utilizada nas análises de atividade antioxidante pela capacidade de reduzir o DPPH. Possui atividade antioxidante, tendo sido considerada um potente inibidor de radicais livres quando comparada ao efeito do α -tocoferol e do ácido ascórbico, no processo de peroxidação lipídica por poder neutralizar os radicais hidroxil e superóxido (Cotelle *et al.*, 1992). Estudo realizado por Andrade e colaboradores (2007) avaliou a atividade antioxidante de compostos fenólicos presentes no extrato etanólicos das flores de *Acacia podalyriifolia*, encontrando um valor de IC₅₀ igual a 4,14 μ g/mL para o padrão rutina. No estudo da atividade antioxidante das folhas

de espinheira-santa, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., a rutina também foi utilizada como padrão e apresentou valor de IC₅₀ de 3,12 µg/mL (Negri; Possamai; Nakashima, 2009). Esses resultados corroboram os resultados encontrados do padrão rutina no presente estudo, e ainda reforçam a atividade antioxidante da fração acetato de etila ML/AcOEt obtida do extrato da espécie *M. leuconeura* Mart., que se apresentou melhor atividade antioxidante em relação ao padrão rutina.

Após a realização do ensaio antioxidante, verificou-se que a fração acetato de etila apresentou ação antioxidante 33 vezes superior à substância rapanona. A medida de IC₅₀ expressa a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH; onde o valor de IC₅₀ obtido para a fração acetato de etila ML/AcOEt foi de 5,31 µg/mL e para a substância rapanona foi de 177,15 µg/mL. Em outras palavras, pode-se dizer que são necessários 5,31 µg/mL da fração acetato para a redução de 50% do DPPH, enquanto que uma solução na concentração de 177,15 µg/mL da substância rapanona é eficiente para promover a redução do radical DPPH.

A determinação da atividade antioxidante apontou a superioridade da fração ML/AcOEt frente ao padrão rutina e frente à substância rapanona. Embora a fração acetato contenha 61 % da substância rapanona, há também a presença de outros constituintes, como o pirogalol (1, 2, 3-trihidroxibenzeno) (27 %) e floroglucinol (2,4 %), os quais já tiveram a atividade antioxidante já constatada (Gülcin, 2012).

Pirogalol é um polifenol encontrado em frutas e vegetais como abacate e damasco. Utilizado na fabricação de produtos farmacêuticos, possui atividade antioxidante comprovada (Gülcin, 2012). Sarikaya (2014) comprovou a capacidade antioxidante do pirogalol utilizando vários testes conhecidos, como poder redutor do Fe³⁺, método de redução de Cu²⁺, método de atividade da acetilcolinesterase e ainda, atividade de eliminação de DPPH. Nesse último, foi comparada a atividade antioxidante do pirogalol frente a padrões conhecidos como hidroxianisol butilado (BHA), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), hidroxitolueno butilado (BHT), α-tocoferol. O valor de IC₅₀ do pirogalol foi de 10,71 µg/mL acima somente do padrão Trolox, com valor de 8,63 µg/mL. Os demais padrões apresentaram IC₅₀ de 15,07 µg/mL (BHA), 11,48 µg/mL (α-tocoferol) e 31,45 µg/mL (BHT). Os resultados mostraram que o pirogalol é um poderoso antioxidante, podendo ser utilizado como fonte de antioxidante natural na indústria farmacêutica.

O floroglucinol é um polifenol com atividade antioxidante comprovada por Kang e colaboradores (2006) que demonstraram redução de formação de células apoptóticas, a

inibição do dano celular pela privação de soro e pela radiação através da eliminação de ERO e ainda aumentou a atividade da catalase e sua expressão proteica. O composto elimina o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroxila e as espécies reativas de oxigênio intracelulares (ROS), evitando, assim, a peroxidação lipídica. No estudo da relação da estrutura-atividade antioxidante do ácido gálico e floroglucinol, presente no extrato de casca verde de pistache (*Pistachia vera*) (Delfanian *et al.*, 2021) foi encontrado um valor de IC₅₀ 5,76 µg/mL para o floroglucinol, relacionando a presença de grupo carboxílico na molécula com a atividade antioxidante.

Os ensaios de toxicidade utilizando o *C. elegans* são bons preditores para os efeitos adversos de muitos compostos em espécies de mamíferos e têm sido utilizados para avaliar a toxicidade de quase todos os tipos tóxicos conhecidos. O *C. elegans* possui mais de 60% ou mais de genes ortólogos humanos, o que possibilita extrapolar os efeitos biológicos estudados nesse modelo para os humanos (Tejeda-Benitez; Olivero-Verbel, 2016).

De acordo com o ensaio de toxicidade, a fração ML/AcOEt e o composto rapanona não são tóxicos até as concentrações de 80 e 60 µg/mL, respectivamente. A fração acetato apresentou atividade antioxidante em concentração 15 vezes inferiores a concentração que impacta na sobrevivência do modelo *C. elegans*, o que é um indício de sua segurança quanto a distância entre a dose tóxica e terapêutica.

9 CONCLUSÃO

A substância isolada da fração acetato de etila, obtida do extrato hidroalcoólico de *M. leuconeura* (EML) foi identificada como rapanona. Este é o primeiro relato do isolamento de rapanona nas entrecascas de *M. leuconeura*, o que contribui com os conhecimentos sobre a composição química desta espécie.

A fração acetato de etila ML/AcOEt apresentou atividade antioxidante com IC₅₀ de 5,31 µg/mL, similar ao padrão rutina com IC₅₀ de 6,59 mg/mL no ensaio DPPH.

Tanto a fração ML/AcOEt quanto a rapanona apresentaram uma toxicidade de 98,18 % de sobrevivência para as concentrações de 40 a 80 µg/mL e 92,37 % de sobrevivência em 60 µg/mL, respectivamente.

ML/AcOEt apresentou moderada atividade antimicrobiana ante *C. jejuni* ATCC 33291, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *S. enterica* ATCC 9184 (CIM 10 a 100 µg/mL).

A rapanona apresentou atividade antimicrobiana significativa para as linhagens *E. faecium* ATCC 4083 e *S. aureus* ATCC 25923 (CIM < 10 µg/mL).

Para as linhagens *C. jejuni* ATCC 33291, *C. perfringens* ATCC 13124, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 e *S. enterica* ATCC 9184, a rapanona apresentou moderada atividade antimicrobiana (CIM 10 a 100 µg/mL).

Os resultados obtidos apoiam o uso popular de fitoterápicos produzidos a partir de *M. leuconeura* no tratamento de infecções microbianas.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, N. A. *et al.* Physicochemical analyses, antioxidant, antibacterial, and toxicity of propolis particles produced by stingless bee *Heterotrigona itama* found in Brunei Darussalam. **Heliyon**, v. 5, n. 9, p. e02476, Sep 2019.
- ABRAHAM, R. J.; PARDASANI, P.; PARDASANI, R. T. Recent advances in 1,4-benzoquinone chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 22, p. 385–421, 2011.
- ALAM, N. *et al.* Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal, Bangladesh**, v. 21, p.143-152, 2013.
- ALBUQUERQUE, Y. R. **Atividades anti-nematoides dos óleos essenciais de *Petroselinum crispum*, *Ruta graveolens* e *Thymus vulgaris* no modelo nematoide *Caenorhabditis elegans***. São Carlos: PPGGEv/UFSCAR, 2019.
- ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n.10, p. 2202-2210, 2010.
- AMARO-LUIS, J.M. *et al.* Myrsicorianol, A New Prenylated Benzoic Acid Derivative from *Myrsine coriacea*. **Natural Product Communications**, v. 3, 2008.
- AMENYA, H.Z. *et al.* A 56-Day Oral Toxicity Study of the Aqueous Extract of *Rapanea melanophloeos* (L.) Mez in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7403087> Acesso em 25 de out. de 2023.
- ANDRADE, C. A. *et al.* Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira Farmacognosia**, vol. 17, n. 2, p. 231-235, 2007.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos, uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, vol. 66, p. 232 – 240, 2007.
- AWINOA, O.S. *et al.* Antimicrobial Activity of 2,5-Dihydroxy-3-methyl-1,4-benzoquinone from *Embelia schimperi*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 63, n. 1-2, p. 47-50, 2008.
- BACCARIN, T. *et al.* Development and validation of an HPLC-PDA method for the determination of myrsinoic acid B in the extracts of *Rapanea ferruginea* Mez. **Talanta**, v. 85, p. 1221-1224, 2011.
- BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BAUER, G.A. ASSIS BRASIL E SILVA, G.; Rücker. Embelin aus den fruchten von *Rapanea umbellate* L. **Phytochemistry**, v. 12, n. 5, p. 1192, 1973.

BERLINCK, R.G.S. *et al.* A Química de Produtos Naturais do Brasil do Século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706-710, 2017.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71-94, 1974.

CARVALHO, A. C. B. *et al.* The Brazilian market of herbal medicinal products and the impacts of the new legislation on traditional medicines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 212, p. 29–35, 2018.

CHALFIE, M. *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, p. 802-05, 1994.

Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. CLSI M100-S26. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2016.

CORSI, A. K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. A transparente window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. **Wormbook**, jun, 2015. Disponível em: http://www.wormbook.org/chapters/www_celegansintro/celegansintro.html. Acesso em: 15 de jun de 2020.

COSTA-ORLANDI, C. B. *et al.* Incorporation of Nonyl 3,4-Dihydroxybenzoate Into Nanostructured Lipid Systems: Effective Alternative for Maintaining Anti-Dermatophytic and Antibiofilm Activities and Reducing Toxicity at High Concentrations. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1154, 2020.

COTELLE, N.; BERNIER, J. L.; HENICHART, J. P.; CATTEAU, J.; GAYDOU, E.; WALLET, J. C. Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. **Free Radical Biology Medicine**, v. 13, p. 211-219, 1992.

DA COSTA, R.C. *et al.* Discovery of the rapanone and suberonone mixture as a motif for leishmanicidal and antifungal applications. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 135-140, 2014.

DAVIN-REGLI, A.; PAGÈS, J-M. Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. **Frontiers in Microbiology**, vol. 6, p. 392, 2015.

DELFIANIAN, M.; SAHARI, M. A.; BARZEGAR, M.; GAVLIGHI, H. A. Structure–antioxidant activity relationships of gallic acid and phloroglucinol. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, p. 5036-46, 2021.

DE MELO BURGER, M.C. *et al.* Antimicrobial activity of the myrsinoic acid A from *Myrsine coriacea* and the semi-synthetic derivatives. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 451–454, 2015.

- EL-HAWARY, S.S., *et al.* HPLC-PDA-MS/MS profiling of secondary metabolites from *Opuntia ficus-indica* cladode, peel and fruit pulp extracts and their antioxidant, neuroprotective effect in rats with aluminum chloride induced neurotoxicity. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 10, p. 2829-2838, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.07.003>. Acesso em 23 de ago. de 2023.
- EPAND, R.M., *et al.* Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1858, p. 980–987, 2015.
- FERREIRA, D.F. SISVAR. Sistema para análise de variância de dados balanceados. Lavras: UFLA, v. 4.3, 2003.
- FREITAS, M.F.; KINOSHITA, L.S. *Myrsine* (Myrsinoideae- Primulaceae) in Southeastern and Southern Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 1, p. 167-189, 2015.
- FREITAS, M. F.; CARRIJO, T. T.; DE LUNA, B. N. Sinopse dos gêneros de Primulaceae no Brasil. **Rodriguésia**, v. 68, n. 1, 2017.
- GÜLCIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 345–91, 2012.
- HENGARTNER, M. O.; HORVITZ, H. R. *C. elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. **Cell**, v.76, p. 665-676, 1994.
- HEMAISWARYA, S., KRUTHIVENTI, A.K., DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, p. 639–652, 2008.
- INÁCIO, M.C. *et al.* Screening test for antibiotics in medicinal plants (STAMP): using powdered plant materials instead of extracts. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, n. 12, p. 2340, 2013.
- IWASA, H. *et al.* Novel EGF pathway regulators modulate *C. elegans* healthspan and lifespan via EGF receptor, PLC- γ , and IP3R activation. **Aging Cell**, v. 9, n. 4, p. 490-505, 2010.
- JUDD, W.S. *et al.* **Sistemática Vegetal Um Enfoque Filogenético**. 3a ed, ARTMED, Porto Alegre, p. 84, 2008.
- KANG, K. A. *et al.* Cytoprotective Effect of Phloroglucinol on Oxidative Stress Induced Cell Damage via Catalase Activation. **Journal of Cell Biochemistry**, v. 97, p. 609–620, 2006.
- KERSTEN, W. Inhibition of RNA synthesis by quinone antibiotics. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**, v. 2, p. 48-57, 1971.
- KIM, M. H J. *et al.* Antimicrobial activities of 1,4-benzoquinones and wheat germ extract. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 20, n. 8, p. 1204–1209, 2010.

- KIRSCHWENG, B.; TÁTRAALJAI, D.; FÖLDES, E.; PUKÁNSZKY, B. Natural antioxidants as stabilizers for polymers. **Polymer Degradation and Stability**, v. 145, 2017. DOI: 10.1016/j. polymdegradstab.2017.07.012.
- KUETE, V. *et al.* Cytotoxicity of Plumbagin, Rapanone and 12 other naturally occurring Quinones from Kenyan Flora towards human carcinoma cells. **BMC Pharmacology and Toxicology**, vol.17, p. 60, 2017. Disponível em: <http://doi10.1186/s40360-016-0104-7> Acesso em 13 de mai de 2021.
- KUMAR, S.; DESHMUKH, R. Embelin as a Potential Drug Molecule: A Review. **J Pharmacogn Nat Prod**, v. 3, p. 144, 2017. Disponível em: <http://doi:10.4172/2472-0992.1000144> Acesso em 18 de mai de 2021.
- KURUVILLA, G.R. *et al.* A new Quinone from *Maesa indica* (Roxb.) A. DC, (Myrsinaceae). **Indian Journal of Chemistry**, v. 49B, p.1637-1641, 2010.
- LEE, C.C *et al.* Bacteremia Due to Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacter cloacae*: Role of Carbapenem Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 9, 2010.
- LUNA, B.N. *et al.* Comparative leaf anatomy of neotropical *Stylogyne* species (Myrsinoideae – Primulaceae) Anatomia foliar comparada de espécies neotropicais de *Stylogyne* (Myrsinoideae – Primulaceae. **Rodriguésia**, v. 64, n. 4, p. 717-726, 2013.
- MACIAS, F. A. *et al.* Plant biocommunicators: their phytotoxicity, degradation studies and potential use as herbicide models. **Phytochemistry Review**, v. 7, p. 179-194, 2008.
- MAKABE, H. *et al.* Myrsinoic Acid E, an Anti-inflammatory Compound from *Myrsine seguinii*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 67, n. 9, p. 2038–2041, 2003.
- MANGURO, L.O.A. *et al.* Benzoquinone derivatives of *Myrsine africana* and *Maesa lanceolata*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 855–862, 2003.
- MEDINA-ALARCÓN, K. P. *et al.* Alkyl Protocatechuate-Loaded Nanostructured Lipid Systems as a Treatment Strategy for *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* In Vitro. **Frontiers Microbiology**, v. 8, p. 1048, 2017.
- MEZ, C. Myrsinaceae. In: ENGLER H. G. A. das Pflanzenreich. **Wilhelm Engelmann**, Berlin, v. 4, p. 236, 1902.
- MISHRA, N. *et al.* DUBEY, A., MISHRA, R., BARIK, N. Study on antioxidant activity of common dry fruits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3316–3320, 2010.
- MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Produtos Naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p.105-111, 2001.
- NAKAMURA-SILVA, R. *et al.* Characterization of multidrug-resistant and virulent *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk clonal group 258 (CG258)

isolated from inpatients in northeastern Brazil. **Archives of Microbiology**, vol 203, p. 4351–4359, 2021.

NEGRI, M. L. S.; POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 553-56, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75n. 3, p. 311-35, 2012.

NIGON, V. M.; FÉLIX, M. History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms. **Wormbook in Genetics**, França, 2017. Disponível em: <http://www.wormbook.org/>. Acesso em 15 de jun. 2020.

NTALLI, N. G.; CABONI, P. Botanical Nematicides: A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 9929–9940, 2012.

OGAWA, H.; NATORI, S. Hydroxybenzoquinones from Myrsinaceae plants -II. Distribution amongst Myrsinaceae plants in Japan. **Phytochemistry**, v. 7, p. 773 -782, 1968.

OHTANI, K.; MAVI, S.; HASTETTMANN, K. Mollscidal and antifungal triterpenoids saponins from *Rapanea melanophloeos* leaves. **Phytochemistry**, v. 33, p. 83-86, 1993.

OMOSA, L. K. et al. Antibacterial activities and structure–activity relationships of a panel of 48 compounds from Kenyan plants against multidrug resistant phenotypes. **SpringerPlus**, v. 5, p. 901, 2016.

O'REILLY, L. P. et al. *C. elegans* in high-throughput drug discovery. **Adv. Drug Deliv. Rev.** Pittsburgh, 2013.

OSPINA, L.F. et al. Inhibition of Acute and Chronic Inflammatory Responses by the Hydroxybenzoquinonic Derivative Rapanone. **Planta Medica**, v. 67, n. 9, p. 791-795, 2001.

OTEGUI, M.S. et al. Studies on tissues associated to hydroxybenzoquinone secretion in *Myrsine laetevirens* (Myrsinaceae). **Nordic Journal of Botany**, v. 18, p. 447-459, 1998.

PEREIRA, A. M. S. et al. Formulário Fitoterápico da Farmácia da Natureza. **São Paulo: Bertolucci**, 2ªed, p. 406, 2014.

PIRES, J. et al. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, **São Paulo**, p. 1-6, 2017.

PITONDO-SILVA, A.; GONÇALVES, G. B.; STEHLING, E. G. **Heavy metal resistance and virulence profile in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Brazilian soils.** *Apmis*, [S.L.], v. 124, n. 8, p. 681-688, 2016.

PORTA-DE-LA-RIVA, M. *et al.* Basic *Caenorhabditis elegans* Methods: Synchronization and Observation. **Journal of Visualized Experiments-Peeref**, v. 64, 2012.

REGUERO, M. T.; CALLE, J.; MATA, R. Estudio Fitoquímico Y Actividad Biológica de La Corteza de *Rapanea guianensis* AUBL DET. WORDSCK. **Revista Colombiana de Ciencias Farmaceuticas**, n.17, 1989.

SARIKAYA, S. B. O. Acetylcholinesterase inhibitory potential and antioxidant properties of pyrogallol. **Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry**, p. 1-6, 2014.

SCHAFER, Freya. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, p. 1191, 2001.

SCORZONI, L. *et al.* Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e60047, 2013.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M.A. A cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics**, n.30, p. 507-512, 1974.

SHAH, V.; SUNDER, R.; DE SOUZA, N. J. Chonemorphine and Rapanone Antiparasitic Agents from Plant Sources. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 4, p. 730–731, 1987.

SHAYE, D. D.; GREENWALD. I. OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. **PLoS ONE** 6: e20085, 2011.

SOUSA, E. T.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Quimica Nova**, v. 39, n. 4, p. 486-495, 2016.

STAHL, B.; ANDERBERG, A. A. Myrsinaceae. In: KUBITZKI, K. The Families and Genera of Vascular Plants. Berlin: Springer Verlag Berlin Heidelberg, v. 6, p. 266- 281, 2004.

STIERNAGLE, T. Maintenance of *Caenorhabditis elegans*. **WormBook : the online review of C. elegans biology**, n. 1999, p. 1–11, 2006.

SULSTON, J. E. *et al.* The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Developmental Biology**, v. 100, p. 64-119, 1983.

TEJEDA-BENITEZ, L.; OLIVERO-VERBEL, J. *Caenorhabditis elegans*, a biological model for research in toxicology, in: reviews of environmental contamination and toxicology, **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 237, p. 1-35, 2016.

TUON, F.F. *et al.* KPC-producing *Enterobacter aerogenes* infection, The **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, p. 324-327, 2015.

VASCONCELOS, S. M. L. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação **Química Nova**, v. 30, p. 1323, 2007.

VEGA-HERNÁNDEZ, K. *et al.* Discerning the antioxidant mechanism of rapanone: A naturally occurring benzoquinone with iron complexing and radical scavenging activities. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 170, p. 134-147, 2017.

WARD, S.; CARREL, J. S. Fertilization and sperm competition in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Developmental Biology**, v. 73, p. 304-321, 1979.

WARREN, J. S.; JOHNSON, K. J.; WARD, P. A. Oxygen radical in cell injury and cell death. **Pathol Immunopathol Res**, v. 6, p. 301-15, 1987.

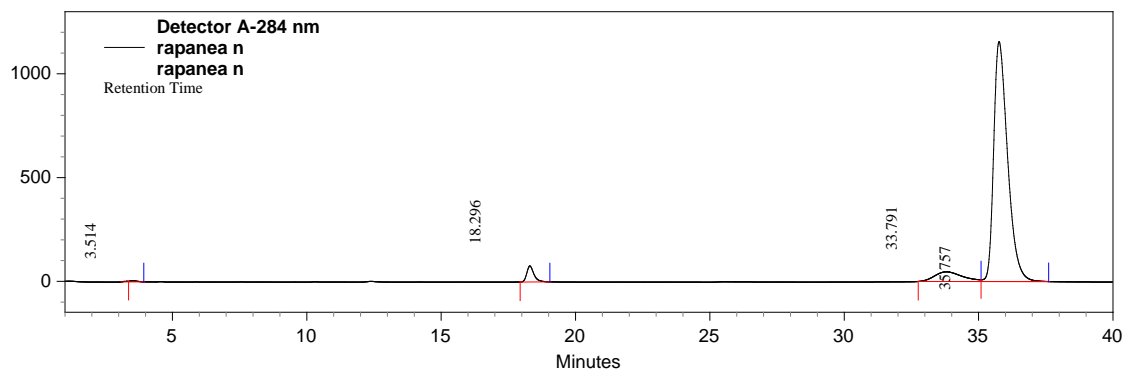
WONG, D.; NIELSEN T. B.; BONOMO R.A. *et al.* Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: A century of challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n.1, p. 409–447, 2017.

ZARKOWER, D. Somatic sex determination (February 10, 2006), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, **WormBook**, 2006. Disponível em: <http://doi/10.1895/wormbook.1.84.1> Acesso em 18 de mai de 2022.

ANEXOS

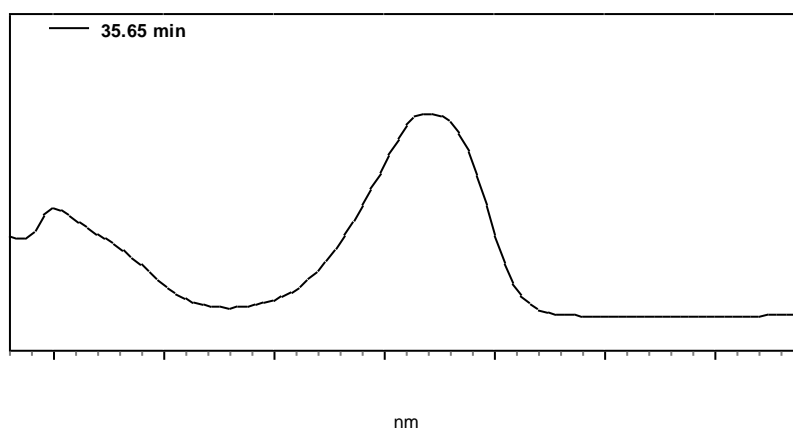
ANEXO 1 - CROMATOGRAMAS E ESPECTROS DE ULTRAVIOLETA OBTIDOS POR CLAE-UV DAS FRAÇÕES N E P

ANEXO 1.1 CROMATOGRAMA DA SUB-FRAÇÃO N

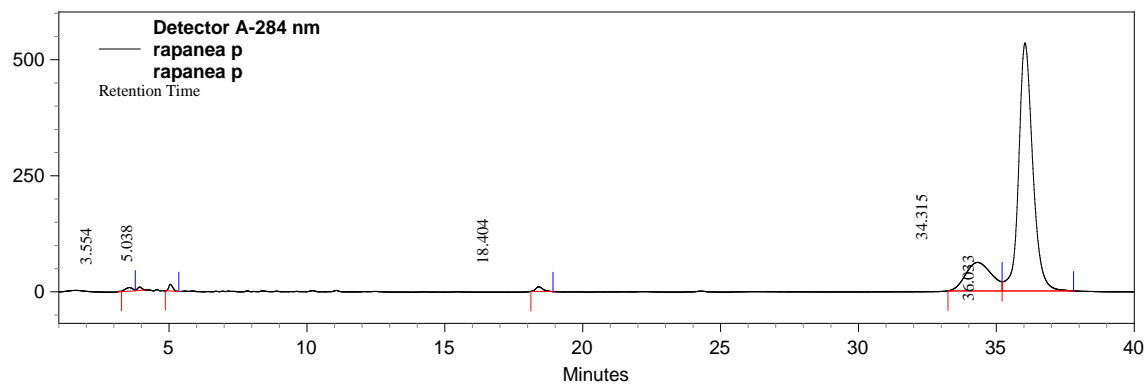


ANEXO 1.2 ESPECTRO DE UV DA SUB-FRAÇÃO N

Spectrum at time 35.65 min.

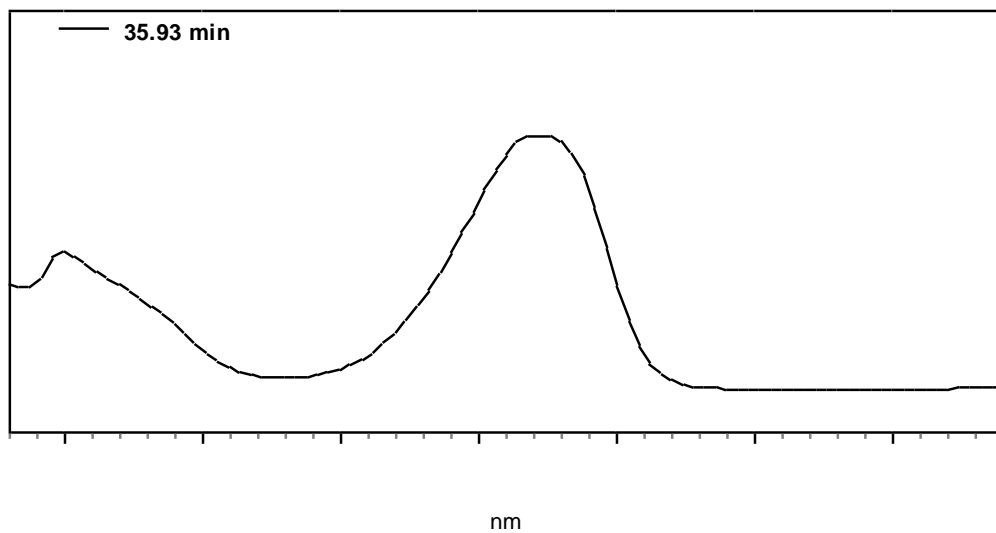


ANEXO 1.3 CROMATOGRAMA DA SUB-FRAÇÃO P



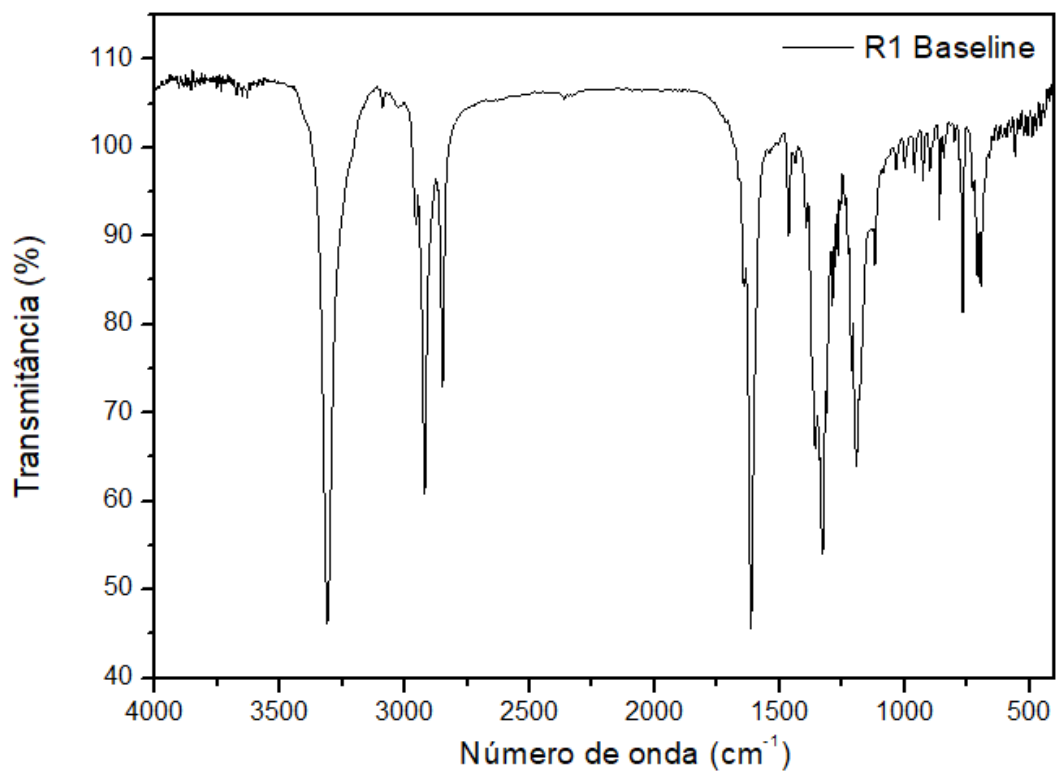
ANEXO 1.4 ESPECTRO DE UV DA SUBFRAÇÃO P

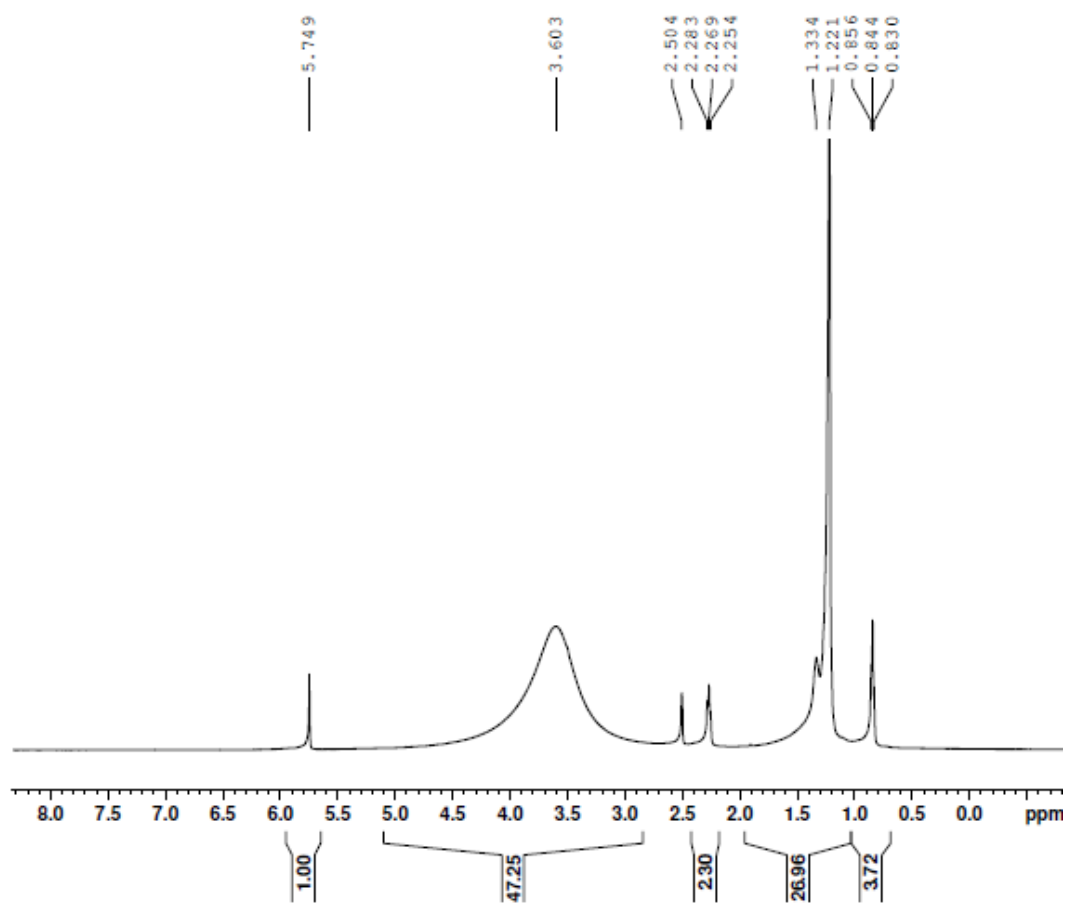
Spectrum at time 35.93 min.

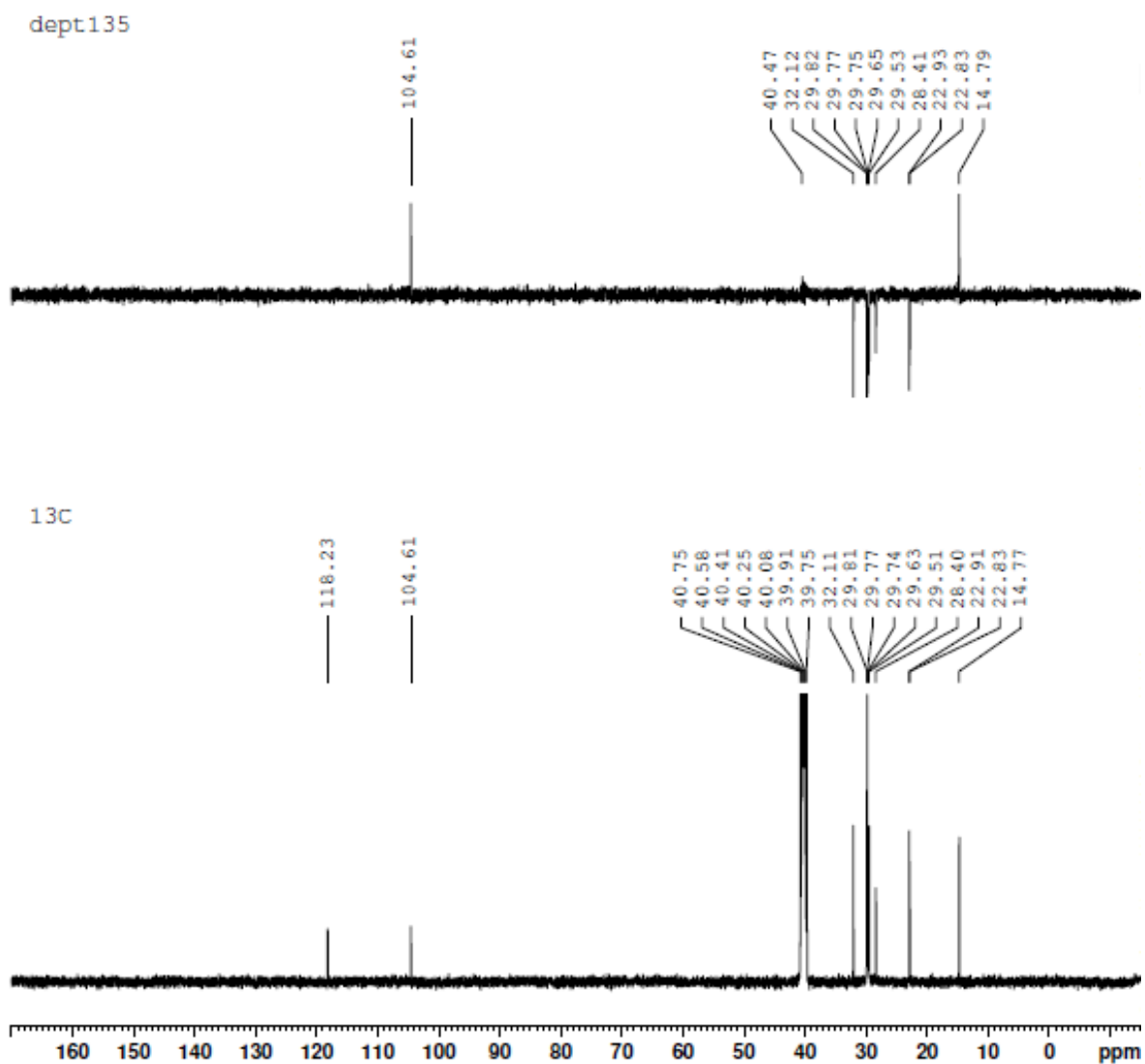


ANEXO 2 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO, RMN¹H, RMN¹³C, HMQC E ESPECTRO DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO DA AMOSTRA R1

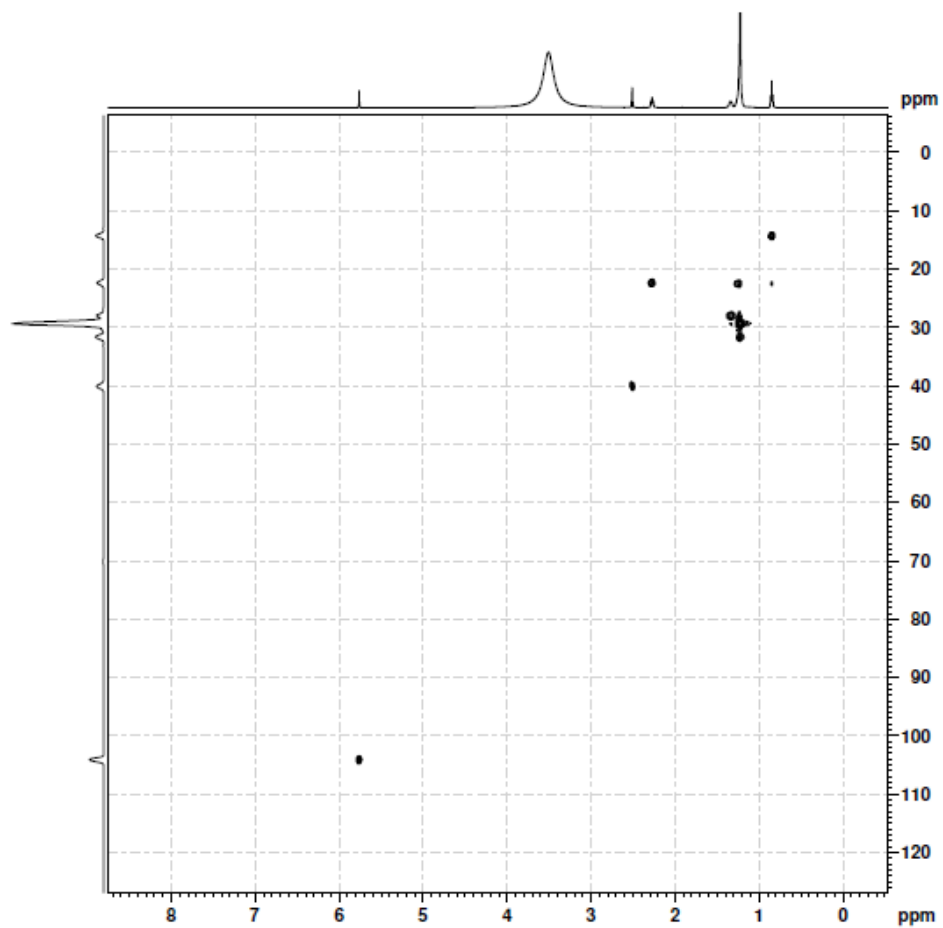
ANEXO 2.1 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AMOSTRA R1



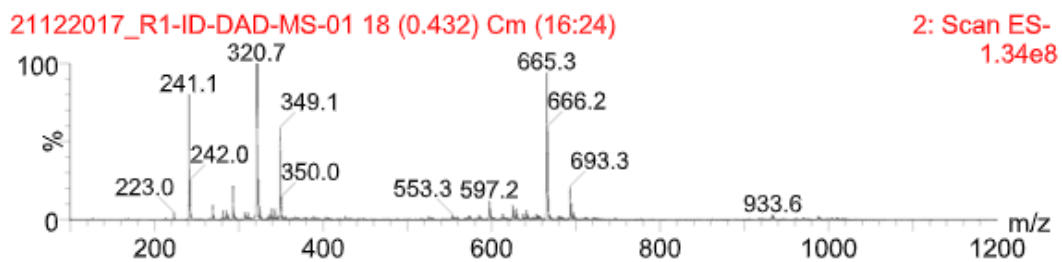
ANEXO 2.2- ESPECTRO DE RMN¹H DA AMOSTRA R1

ANEXO 2.3-ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA AMOSTRA R1

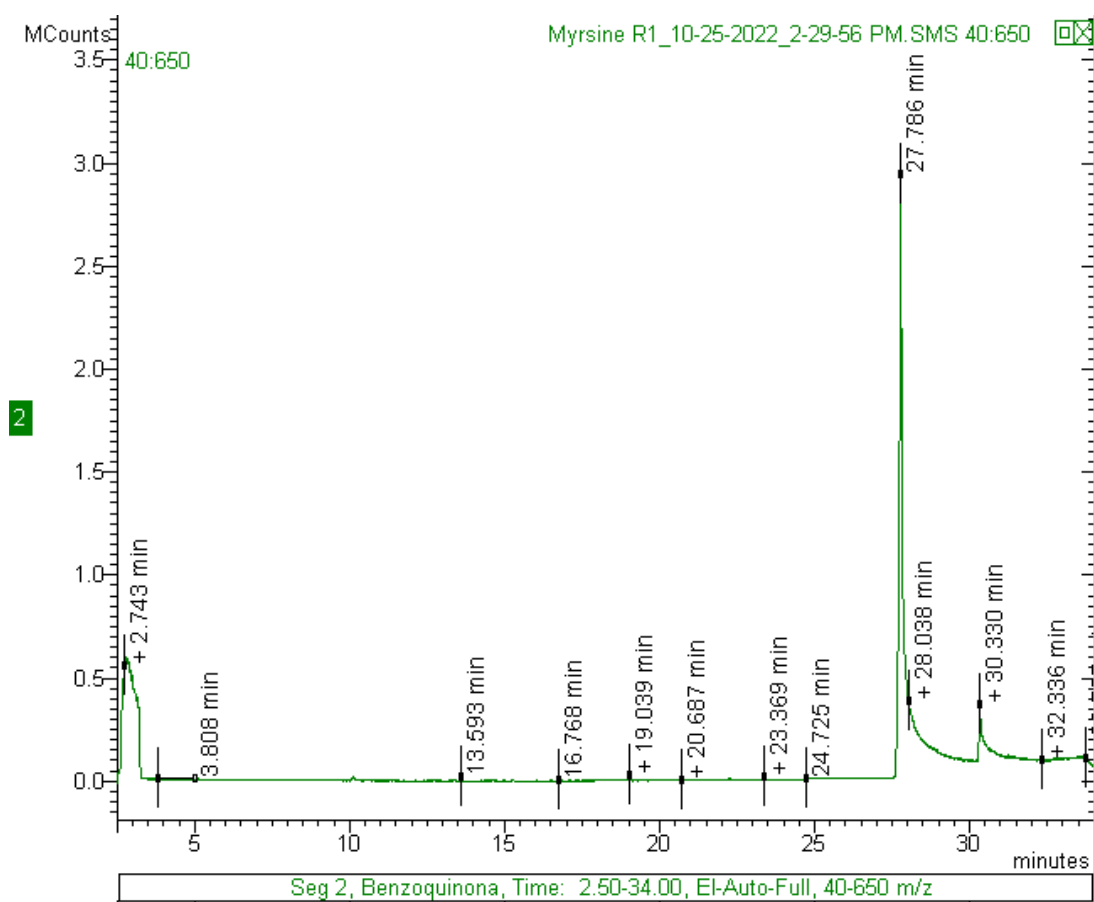
ANEXO 2.4 ESPECTRO DE HSQC DA AMOSTRA R1



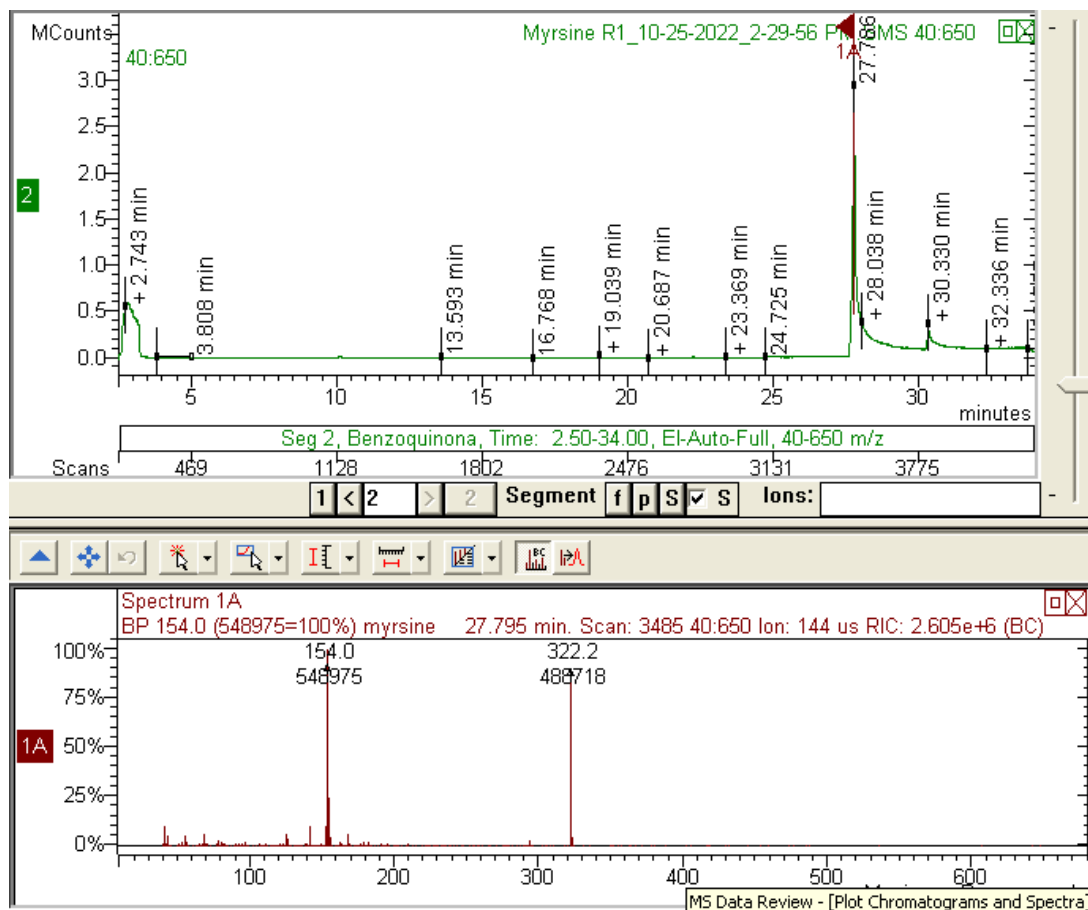
ANEXO 2.5 ESPECTRO DE MASSAS DA AMOSTRA R1 OBTIDO EM MODO NEGATIVO



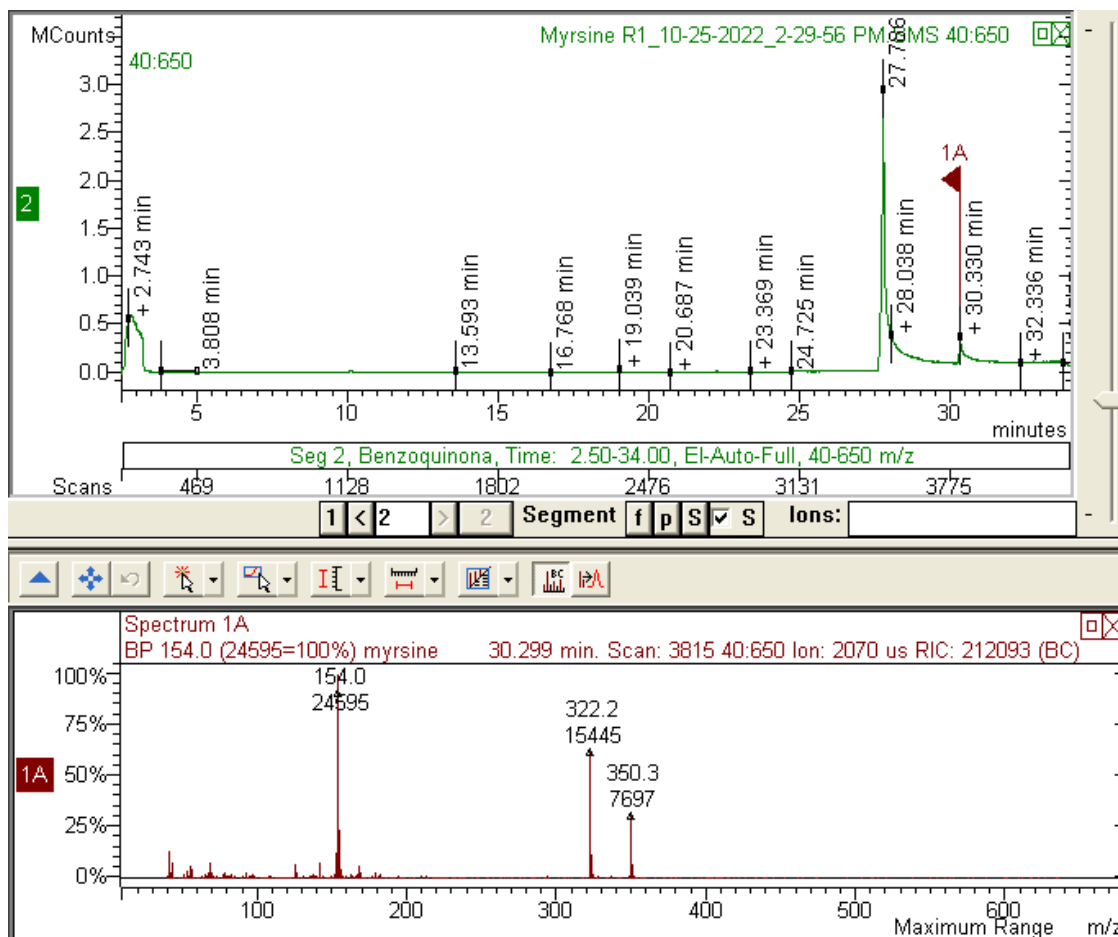
ANEXO 2.6- CROMATOGRAMA DA AMOSTRA R1 ANALISADA POR CG-EM



ANEXO 2.7- ESPECTRO DE MASSAS DA SUBSTÂNCIA ELUÍDA EM T=27,8 min.

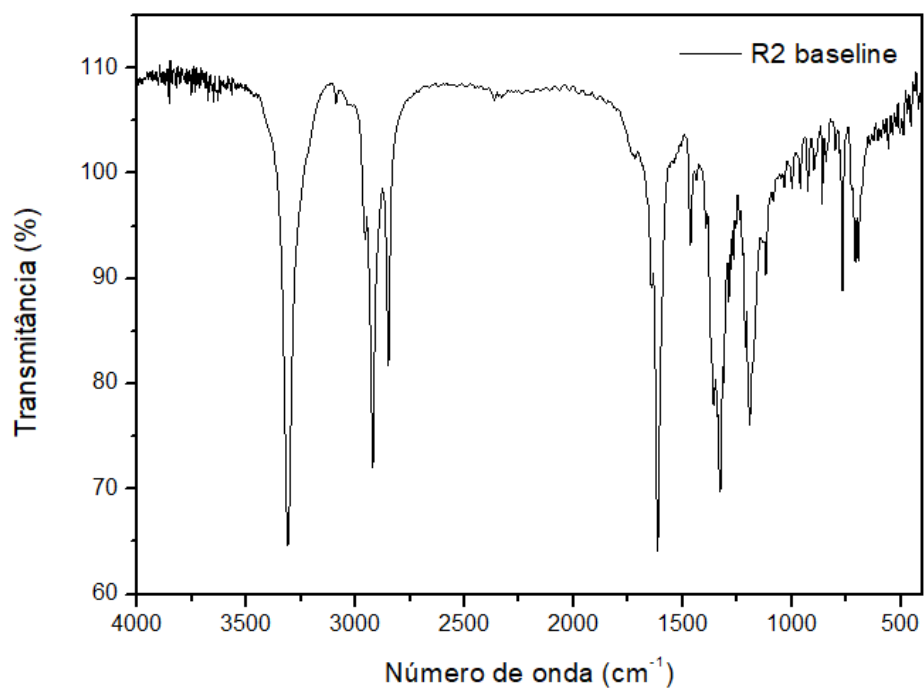


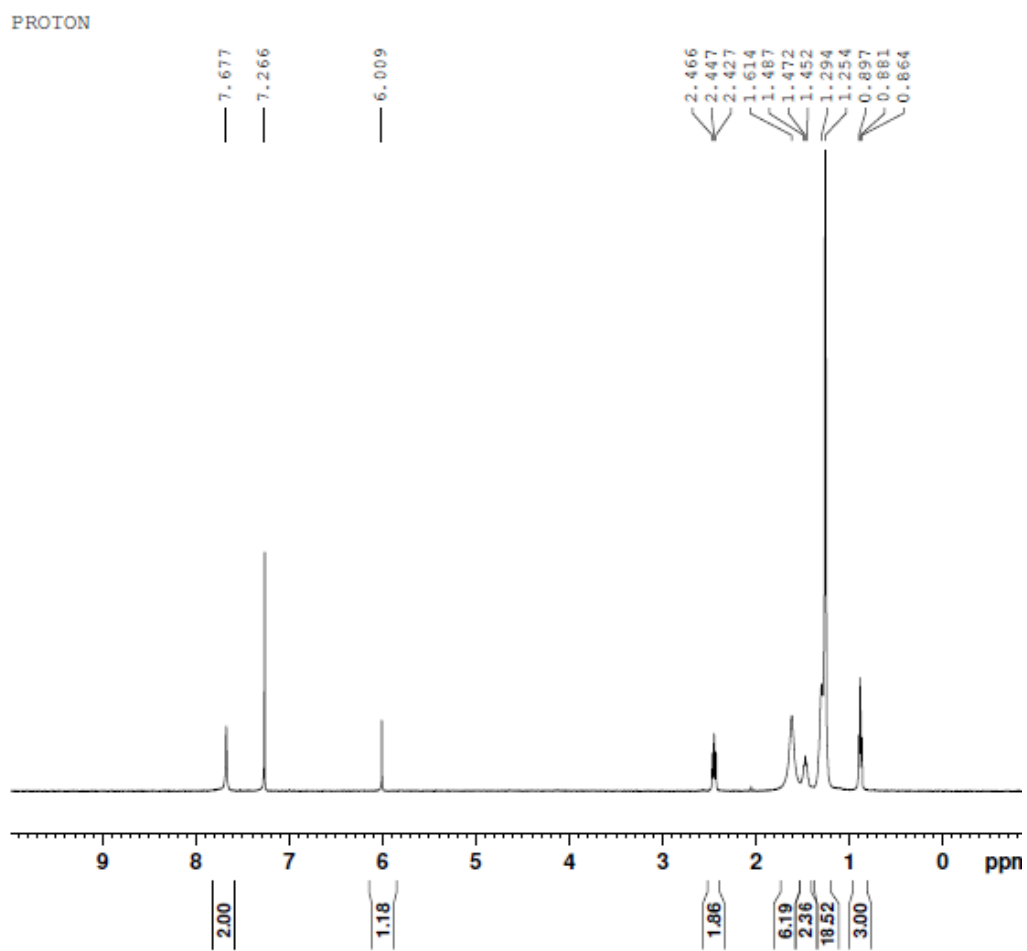
ANEXO 2.8– ESPECTRO DE MASSAS DA SUBSTÂNCIA ELUÍDA EM T=30,3 min.

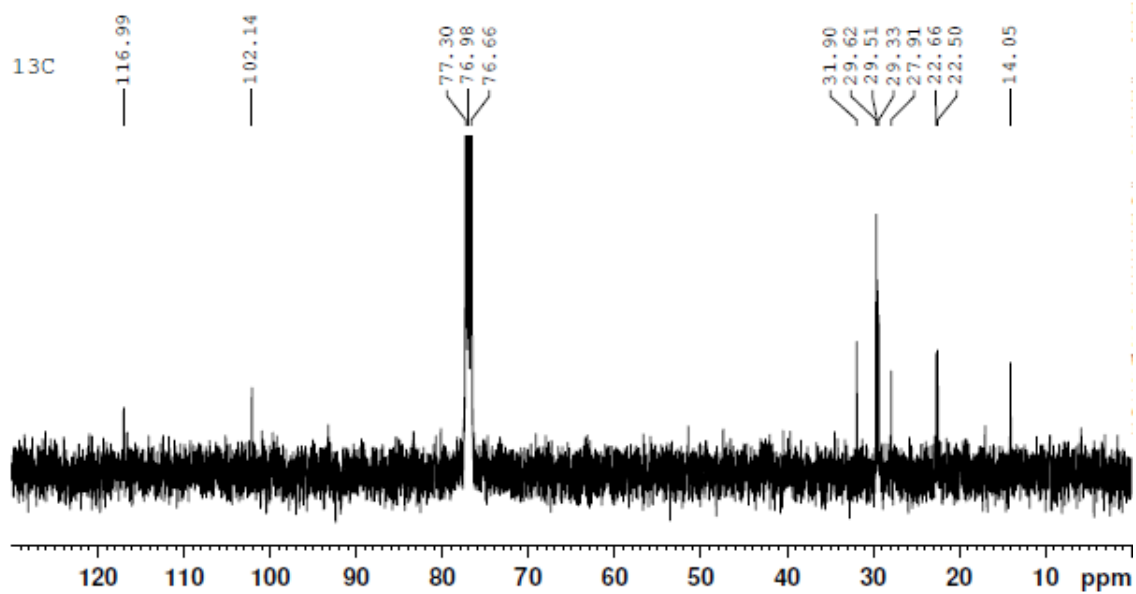


ANEXO 3 — ESPECTROS DE INFRAVERMELHO, RMN¹H, RMN¹³C, HMQC E ESPECTRO DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO DA AMOSTRA R2

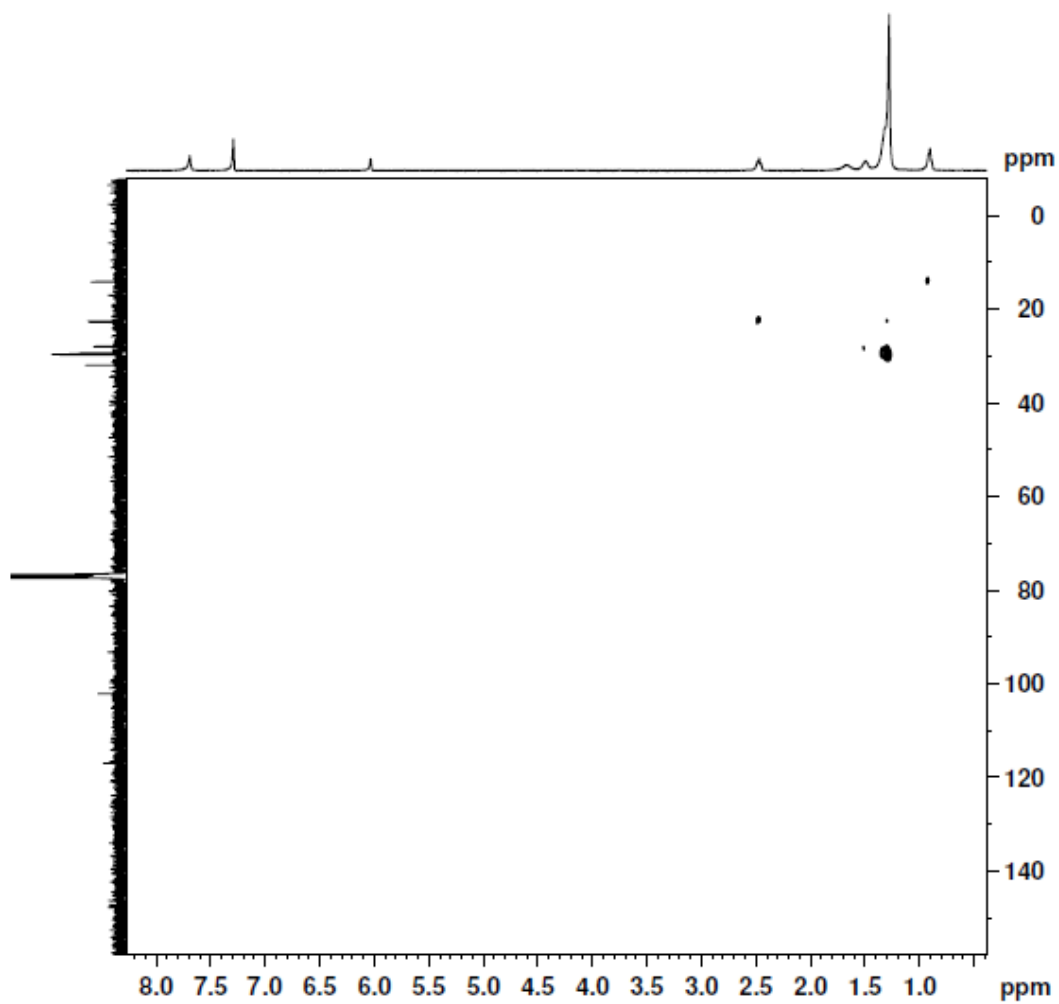
ANEXO 3.1-ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AMOSTRA R2



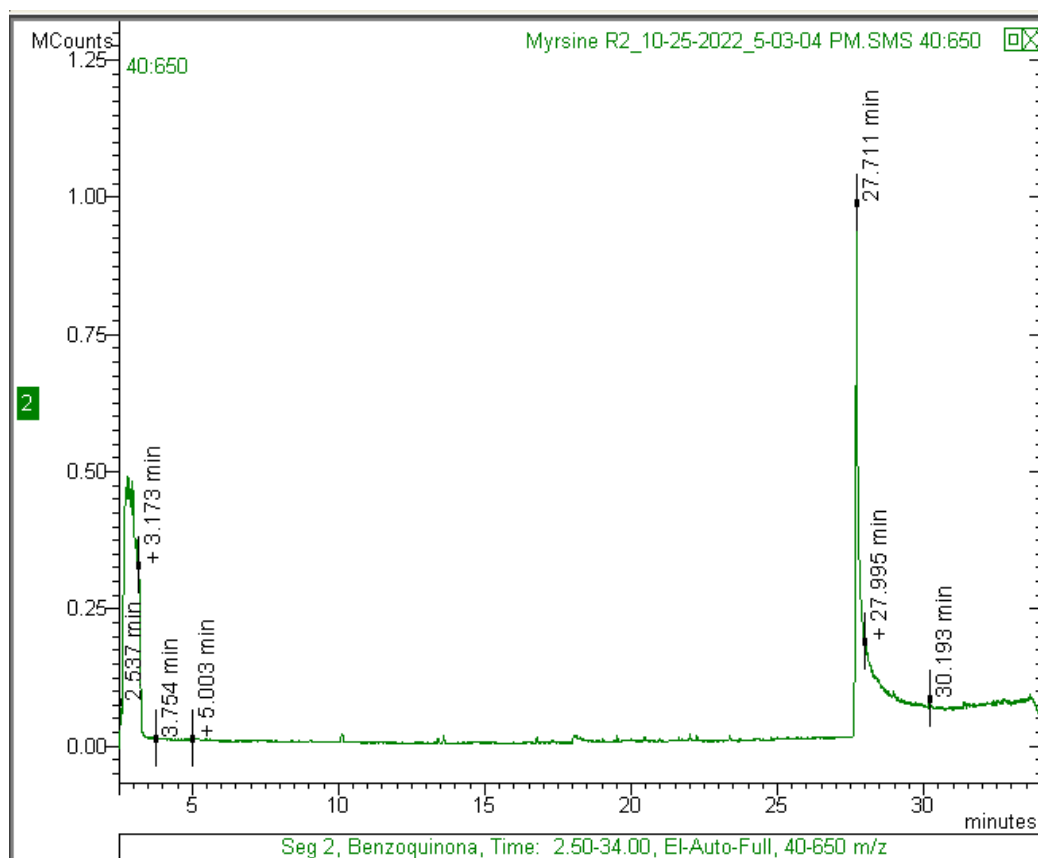
ANEXO 3.2 - ESPECTRO DE RMN¹H DA AMOSTRA R2

ANEXO 3.3 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA AMOSTRA R2

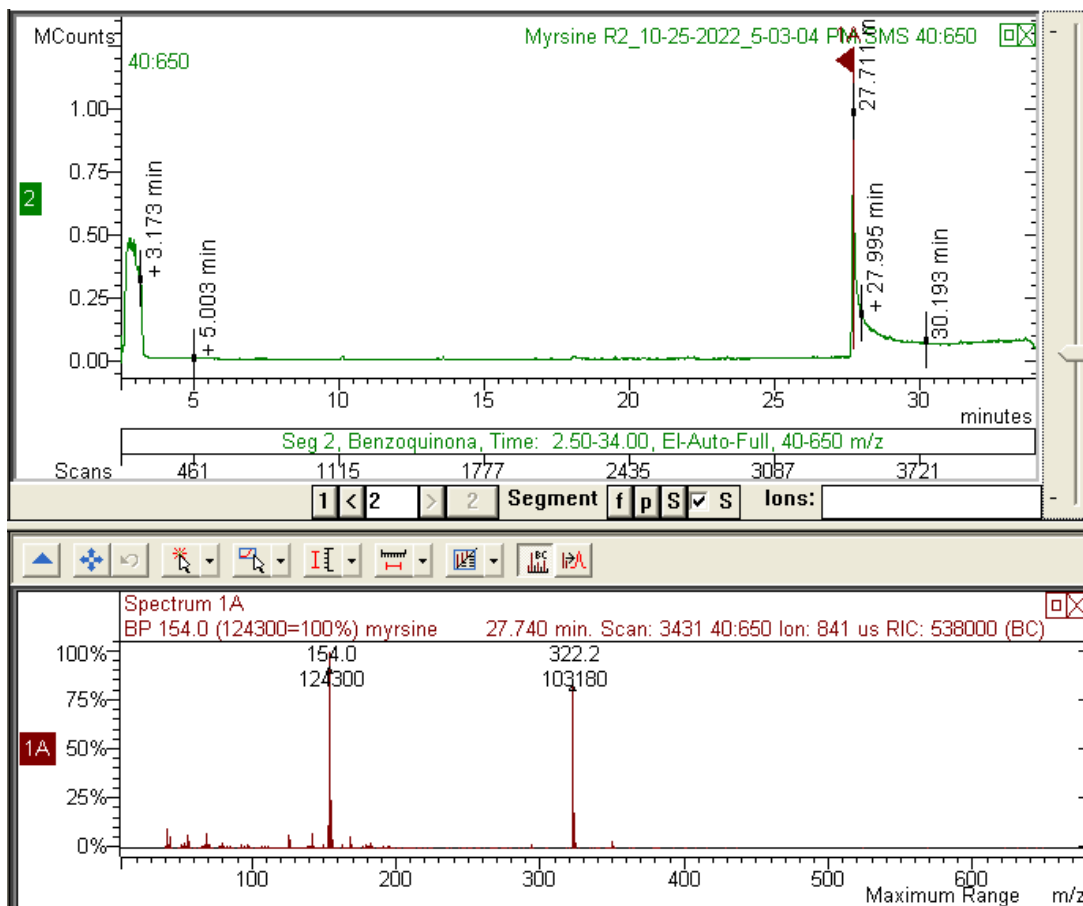
ANEXO 3.4 - ESPECTRO DE HSQC DA AMOSTRA R2



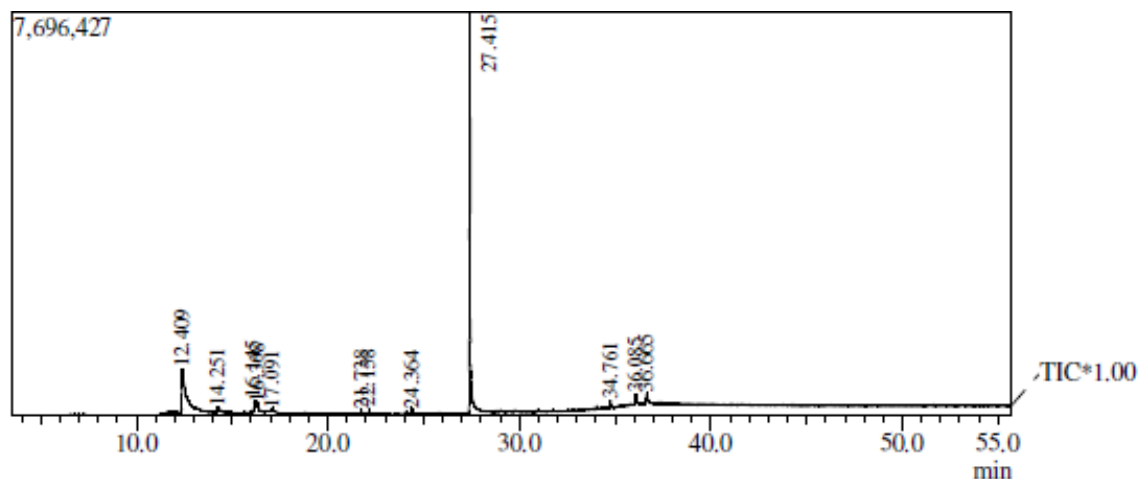
ANEXO 3.5 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA R2 ANALISADA POR CG-EM



ANEXO 3.6 – ESPECTRO DE MASSAS DA SUBSTÂNCIA ELUÍDA EM T=27,7 MIN.



ANEXO 4 - CROMATOGRAMA E ESPECTRO DE MASSAS DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA “ML/AcOEt” ANALISADA POR CG-EM



Peak Report TIC				
Peak#	R.Time	Area	Area%	Name
1	12.409	9568620	26.90	1,2,3-Benzenetriol
2	14.251	854514	2.40	.beta.-D-Glucopyranose, 1,6-anhydro-
3	16.145	858302	2.41	1,3,5-Benzenetriol
4	16.308	246495	0.69	Phenol, 3,4,5-trimethoxy-
5	17.091	146781	0.41	2,5-Dimethoxythiophenol
6	21.738	201382	0.57	n-Hexadecanoic acid
7	22.158	187783	0.53	Hexadecanoic acid, ethyl ester
8	24.364	227995	0.64	Ethyl linoleate
9	27.415	21787446	61.24	Sebacic acid, 2,6-dimethoxyphenyl tridec
10	34.761	241116	0.68	dl.-alpha.-Tocopherol
11	36.085	469507	1.32	Stigmasterol
12	36.665	785325	2.21	Stigmast-5-en-3-ol, (3.beta.,24S)- (CAS)
		35575266	100.00	

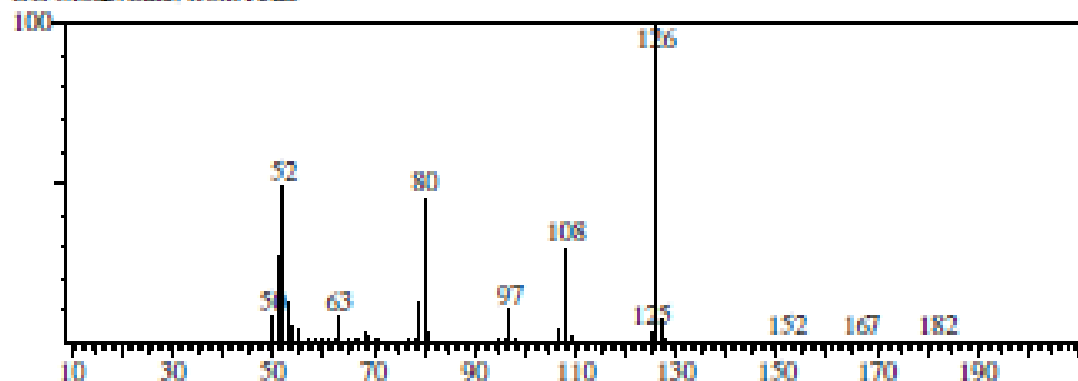
Library

<< Target >>

Line#:1 R.Time:12.410(Scan#:1783) MassPeak:49

RawMode: Averaged 12.405-12.415(1782-1784) BasePeak:126.10(225337)

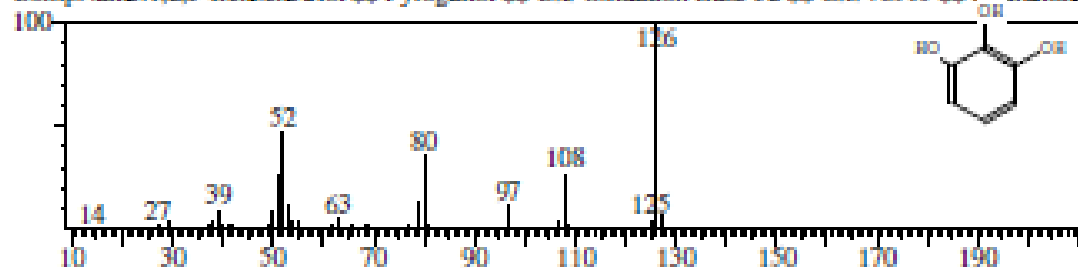
BG Mode:Calc. from Peak



Hit#:1 Entry:6372 Library:NIST11.lib

SI:97 Formula:C6H6O3 CAS:87-66-1 MolWeight:126 RetIndex:1342

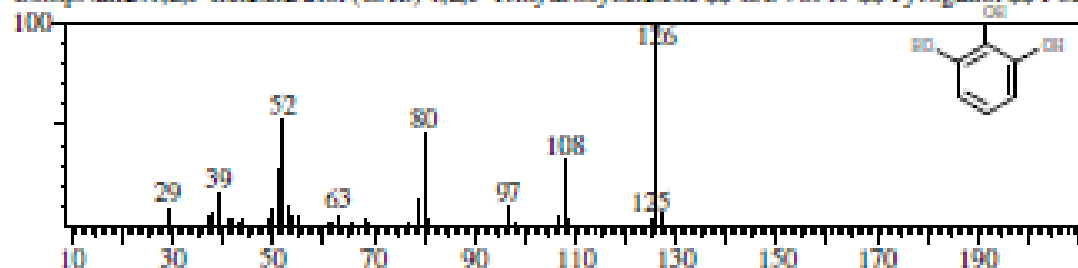
CompName:1,2,3-Benzenetriol \$\$ Pyrogallol \$\$ C.I. Oxidation Base 32 \$\$ C.I. 76515 \$\$ Furamine



Hit#:2 Entry:18720 Library:WILEY7.LIB

SI:97 Formula:C6H6O3 CAS:87-66-1 MolWeight:126 RetIndex:0

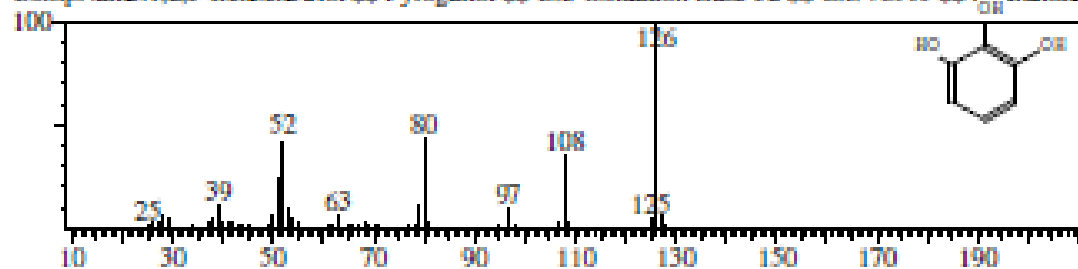
CompName:1,2,3-Benzenetriol (CAS) 1,2,3-Trihydroxybenzene \$\$ C.I. 76515 \$\$ Furamine



Hit#:3 Entry:4738 Library:NIST11s.lib

SI:97 Formula:C6H6O3 CAS:87-66-1 MolWeight:126 RetIndex:1342

CompName:1,2,3-Benzenetriol \$\$ Pyrogallol \$\$ C.I. Oxidation Base 32 \$\$ C.I. 76515 \$\$ Furamine

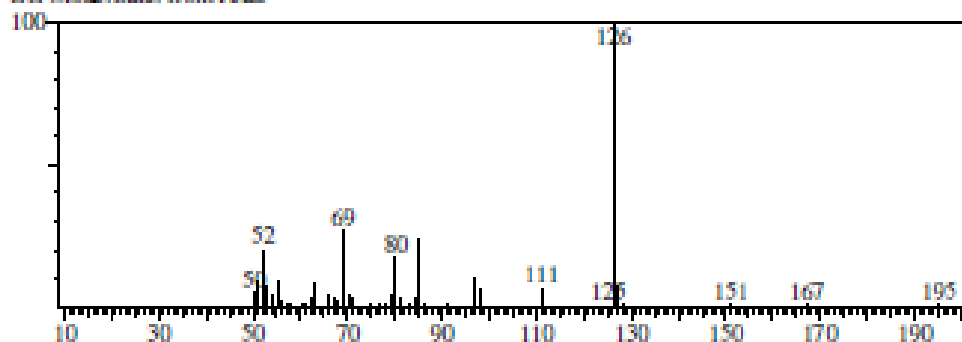


<< Target >>

Line#3 R Time:16.145(Scan#:2530) MassPeak:42

RawMode:Averaged 16.140-16.150(2529-2531) BasePeak:126.10(63844)

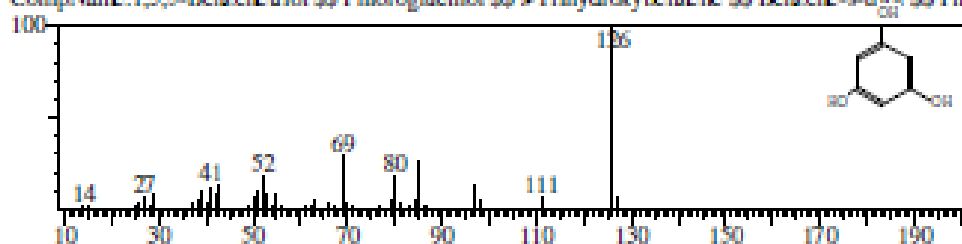
BG Mode:Calc. from Peak



Hit#1 Entry:6376 Library:NIST11.lib

SE96 Formula:C6H6O3 CAS:108-73-6 MolWeight:126 RetIndex:1342

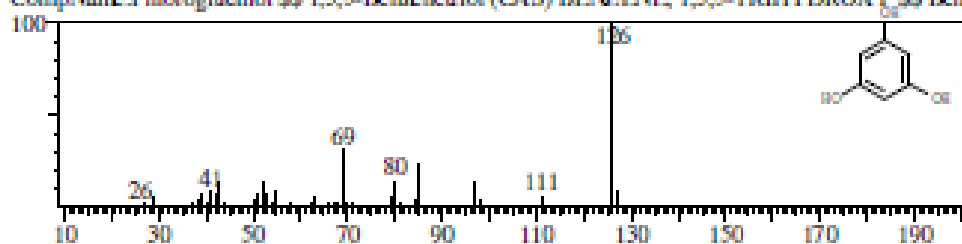
CompName:1,3,5-Benzenetriol \$\$ Phloroglucinol \$\$ s-Trihydroxybenzene \$\$ Benzene-s-triol \$\$ Phl



Hit#2 Entry:18725 Library:WILEY7.LIB

SE95 Formula:C6H6O3 CAS:108-73-6 MolWeight:126 RetIndex:0

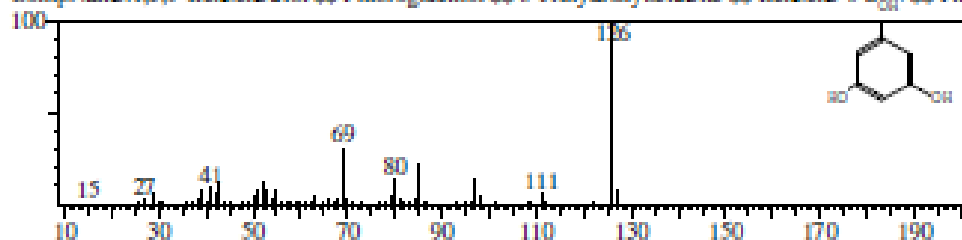
CompName:Phloroglucinol \$\$ 1,3,5-Benzenetriol (CAS) BENZENE, 1,3,5-TRIHYDROXY \$\$ Ben



Hit#3 Entry:4733 Library:NIST11s.lib

SE95 Formula:C6H6O3 CAS:108-73-6 MolWeight:126 RetIndex:1342

CompName:1,3,5-Benzenetriol \$\$ Phloroglucinol \$\$ s-Trihydroxybenzene \$\$ Benzene-s-triol \$\$ Phl

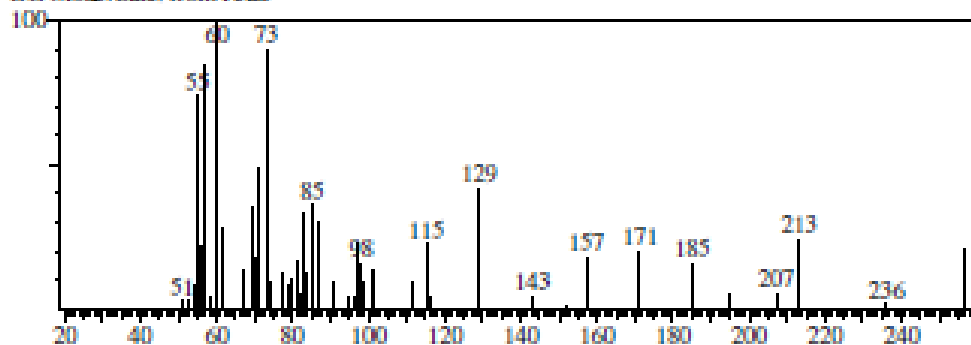


<< Target >>

Line#6 R.Time:21.735(Scan#:3648) MassPeak:45

RawMode:Averaged 21.730-21.740(3647-3649) BasePeak:60.00(8552)

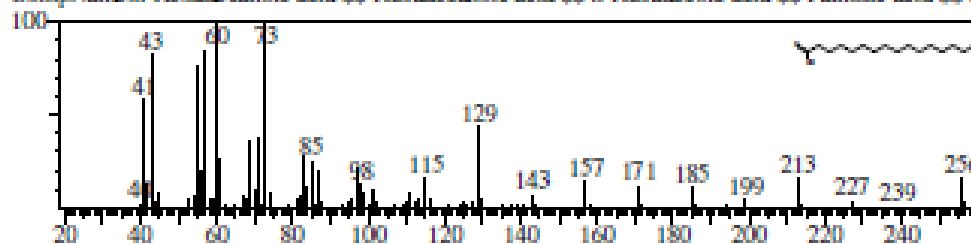
BG Mode:Calc. from Peak



Hit#1 Entry:23313 Library:NIST11s.lib

SE91 Formula:C16H32O2 CAS:57-10-3 MolWeight:256 RetIndex:1968

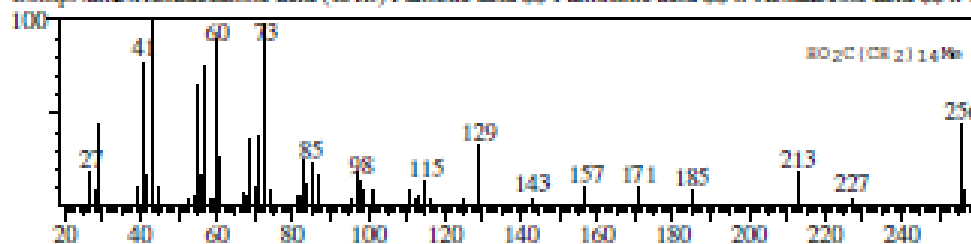
CompName:n-Hexadecanoic acid \$\$ Hexadecanoic acid \$\$ n-Hexadecic acid \$\$ Palmitic acid \$\$ P



Hit#2 Entry:164461 Library:WILEY7.LIB

SE89 Formula:C16H32O2 CAS:57-10-3 MolWeight:256 RetIndex:0

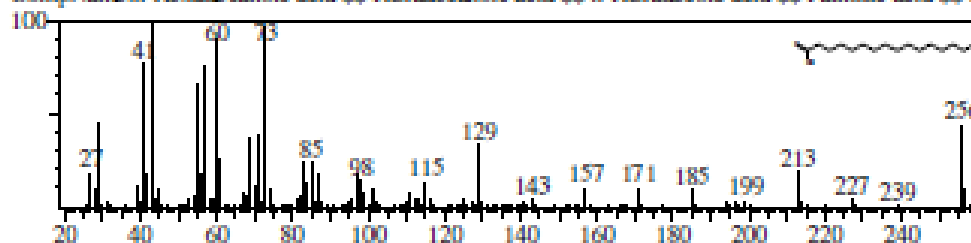
CompName:Hexadecanoic acid (CAS) Palmitic acid \$\$ Palmitic acid \$\$ n-Hexadecic acid \$\$ n-H



Hit#3 Entry:23305 Library:NIST11s.lib

SE89 Formula:C16H32O2 CAS:57-10-3 MolWeight:256 RetIndex:1968

CompName:n-Hexadecanoic acid \$\$ Hexadecanoic acid \$\$ n-Hexadecic acid \$\$ Palmitic acid \$\$ P

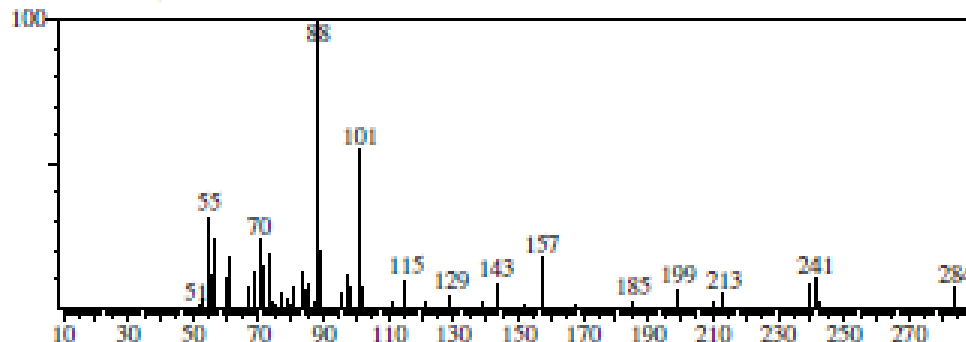


<< Target >>

Line#:7 R.Time:22.155(Scan#:3732) MassPeak:47

RawMode:Averaged 22.150-22.160(3731-3733) BasePeak:88,10(18744)

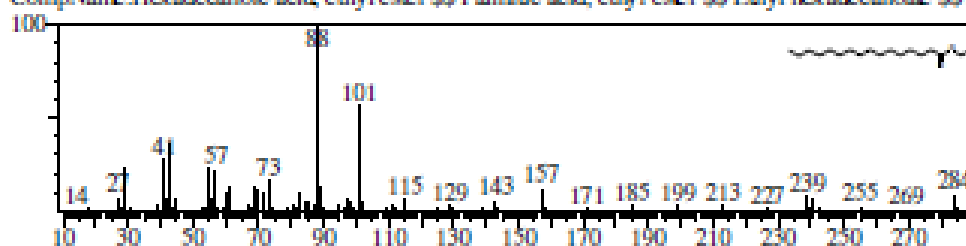
BG Mode:Calc. from Peak



Hit#:1 Entry:106188 Library:NIST11.lib

SE91 Formula:C18H36O2 CAS:628-97-7 MolWeight:284 RetIndex:1978

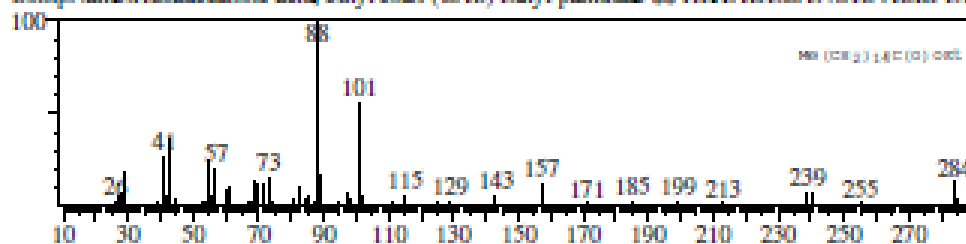
CompName:Hexadecanoic acid, ethyl ester \$\$ Palmitic acid, ethyl ester \$\$ Ethyl hexadecanoate \$\$ F



Hit#:2 Entry:195605 Library:WILEY7.LIB

SE91 Formula:C18H36O2 CAS:628-97-7 MolWeight:284 RetIndex:0

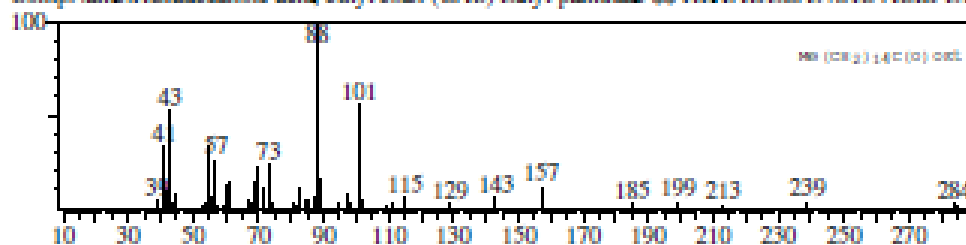
CompName:Hexadecanoic acid, ethyl ester (CAS) Ethyl palmitate \$\$ HEXADECANOIC ACID ET



Hit#:3 Entry:195615 Library:WILEY7.LIB

SE91 Formula:C18H36O2 CAS:628-97-7 MolWeight:284 RetIndex:0

CompName:Hexadecanoic acid, ethyl ester (CAS) Ethyl palmitate \$\$ HEXADECANOIC ACID ET

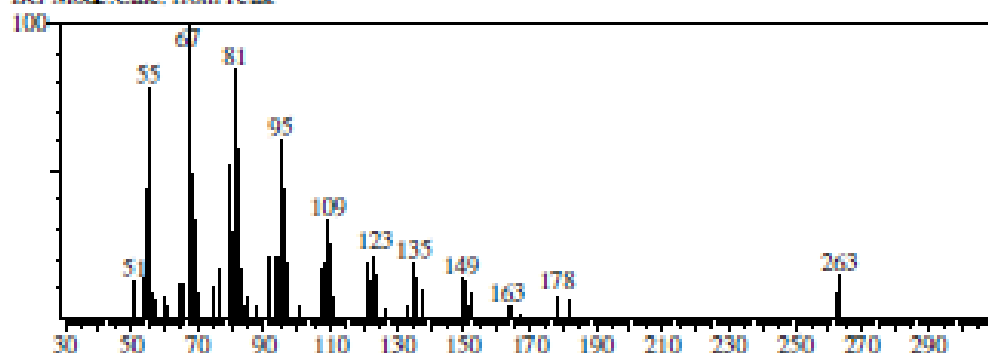


<< Target >>

Line#:8 R.Time:24.365(Scan#:4174) MassPeak:57

RawMode: Averaged 24.360-24.370(4173-4175) BasePeak:67.10(9726)

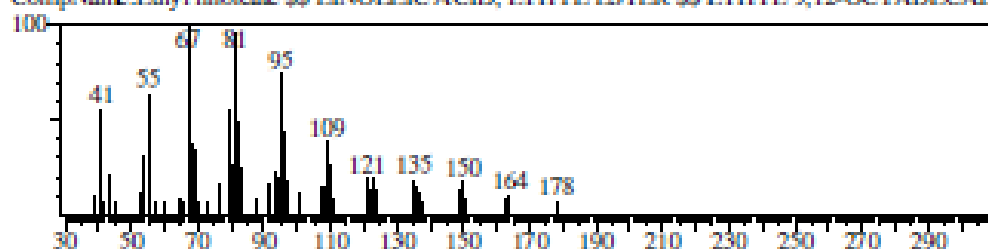
BG Mode:Calc. from Peak



Hit#:1 Entry:219477 Library:WILEY7.LIB

SE:92 Formula:C20H36O2 CAS:544-35-4 MolWeight:308 RetIndex:0

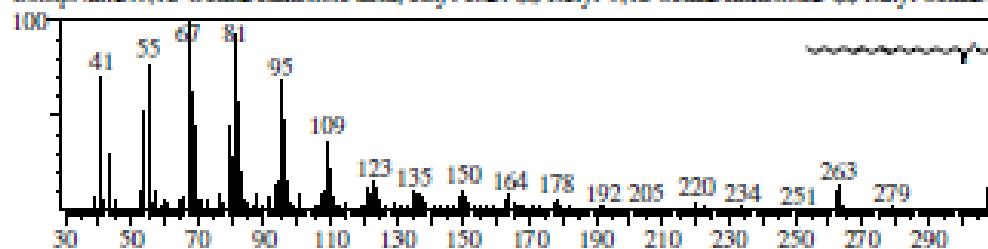
CompName:Ethyl linoleate \$\$ LINOLEIC ACID, ETHYL ESTER \$\$ ETHYL 9,12-OCTADECADI



Hit#:2 Entry:124948 Library:NIST11.Lib

SE:91 Formula:C20H36O2 CAS:7619-08-1 MolWeight:308 RetIndex:2193

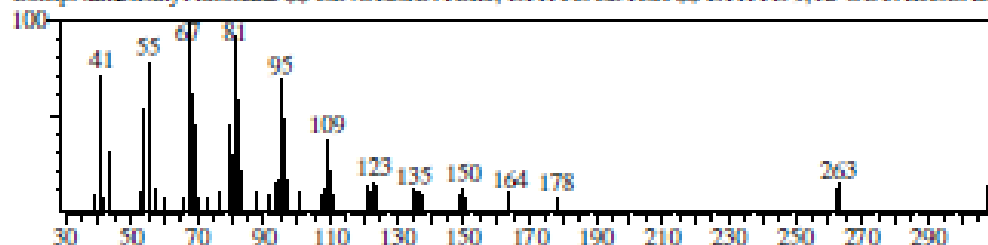
CompName:9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester \$\$ Ethyl-9,12-octadecadienoate \$\$ Ethyl octadec

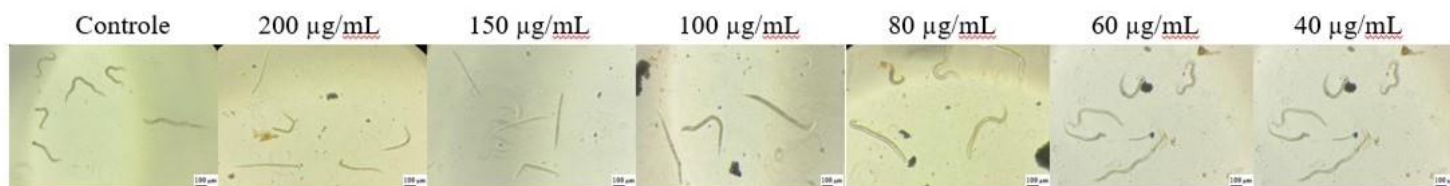


Hit#:3 Entry:219478 Library:WILEY7.LIB

SE:91 Formula:C20H36O2 CAS:544-35-4 MolWeight:308 RetIndex:0

CompName:Ethyl linoleate \$\$ LINOLEIC ACID, ETHYL ESTER \$\$ ETHYL 9,12-OCTADECADI



ANEXO 5 - ENSAIO DE TOXICIDADE NO MODELO IN VIVO *Caenorhabditis elegans***ANEXO 5.1 - *C. elegans* TRATADOS COM FRAÇÃO ACETATO DE *Myrsine leuconeura*****ANEXO 5.2 - *C. elegans* TRATADOS COM RAPANONA**